Untersuchungen über die intestinale Absorptionsquote von Inosin beim Menschen und den Anteil von Inosin am Gesamtpuringehalt von Fleisch

Helene Gimpel

Diss.
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544309_0019

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. N. Zöllner

Untersuchungen über die intestinale Absorptionsquote von Inosin beim Menschen und den Anteil von Inosin am Gesamtpuringehalt von Fleisch

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Helene Gimpel
aus München

München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Gröbner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gröbner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.1984

DISSERTATIONS · UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
Verzeichnis der Abkürzungen		1
1.	E I N L E I T U N G	2
2.	Z I E L D E R A R B E I T	7
3.	M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	9
3.1.	Durchführung des Ernährungsversuchs	9
3.1.1.	Zusammensetzung der Diät	9
3.1.2.	Testsubstanz	10
3.1.3.	Kalorienberechnung	10
3.1.4.	Das Versuchspersonenkollektiv	11
3.2.	Messung des Plasmasäurespiegels und der renalen Harnsäureausscheidung	13
3.2.1.	Gewinnung von Blutplasma	13
3.2.2.	Sammeln und Aufarbeiten des 24-Stunden-Urins	13
3.2.3.	Harnsäurebestimmung	14
3.2.4.	Bestimmung der renalen Kreatininausscheidung	18
3.3.	Bestimmung des Puringehalts von Fleisch	18
3.3.1.	Herstellung von Säureextrakten aus Fleisch	18
3.3.2.	Durchführung der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Messungen	20
3.3.3.	Bestimmung des RNS-Purin-Ribose-Gehalts	24
3.3.4.	Bestimmung des DNS-Purin-Desoxyribose-Gehalts	25

4.	E R G E B N I S S E	26
4.1.	Ergebnisse des Ernährungsversuchs	26
4.1.1.	Ergebnisse von Versuchsperson E	26
4.1.2.	Ergebnisse von Versuchsperson M	30
4.1.3.	Ergebnisse von Versuchsperson Z	34
4.1.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse des Ernährungsversuchs	38
4.2.	Ergebnisse der Bestimmung des Puringehalts von Fleisch	42
4.2.1.	Ergebnis der Bestimmung des Hypoxanthin- und Inosingehalts von Fleisch	42
4.2.2.	Ergebnis der Bestimmung des Purinnukleotid-gehalts von Fleisch	47
4.2.3.	Ergebnis der Bestimmung des RNS-Purin-Ribose-Gehalts	54
4.2.4.	Ergebnis der Bestimmung des DNS-Purin-Desoxy-ribose-Gehalts	58
4.2.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung des Puringehalts von Fleisch	61
5.	D I S K U S S I O N	64
5.1.	Diskussion der Ergebnisse des Ernährungsversuchs	64
5.2.	Diskussion der Ergebnisse der Purinbestimmung in Fleisch	68
6.	Z U S A M M E N F A S S U N G	72
7.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	74
8.	L E B E N S L A U F	79

Verzeichnis der Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DNS	Desoxyribonucleinsäure
GMP	Guanosinmonophosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HS	Harnsäure
IMP	Inosinmonophosphat
KG	Körpergewicht
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
RHSA	renale Harnsäureausscheidung
RNS	Ribonukleinsäure
TCA	Trichloressigsäure
UDP	Uridindiphosphat
XMP	Xanthosinmonophosphat

1. EINLEITUNG

Mit der Nahrung aufgenommene und im Körper de novo synthetisierte Purine werden in Dünndarm und Leber zu Harnsäure abgebaut. Dieses Endprodukt des Purinkatabolismus wird zu 2/3 - 4/5 über die Nieren und zu 1/5 - 1/3 über den Darm mit einer so geringen Clearance eliminiert, daß es in Blutplasma und interstitieller Flüssigkeit akkumuliert. Bei familiär erniedrigter Harnsäureclearance und/oder zu großer Purinzufuhr mit der Nahrung kann die akkumulierende Harnsäure ihre maximale Löslichkeit (in Plasma 6,5mg/100ml) überschreiten und in Geweben und Harnwegen bzw. Nieren auskristallisieren. Hierdurch werden die Symptome der Gicht - Arthritis, Tophi und Urolithiasis - verursacht. Der Zusammenhang zwischen üppiger, fleischreicher Ernährung, dem Auftreten von Gichtsymptomen und deren Verschwinden bei gemäßigter Lebensweise war schon Hippokrates bekannt. Diese Erfahrung bestätigte sich in jüngerer Zeit erneut: während und unmittelbar nach den letzten beiden Weltkriegen stellte die Gicht eine äußerst seltene Erkrankung dar. Mit dem aufblühenden Wohlstand und der damit verbundenen Eßkultur nahm die Inzidenz dieser Krankheit wieder rasch zu (31).

Über diese mehr allgemeinen Beobachtungen hinaus liegen zahlreiche Einzeluntersuchungen über den Einfluß von Nahrungspurinen auf den Harnsäurestoffwechsel vor; die z.T. widersprüchlichen Ergebnisse sowie noch offene Fragen erlauben jedoch weiterhin kein eindeutiges und exaktes Gesamtbild der Zusammenhänge zwischen Ernährung und Harnsäurebildung beim Menschen. Ein Hauptproblem stellen die z.T. recht unterschiedlichen Angaben über den Puringehalt von Nahrungsmitteln dar; in den meisten Nahrungsmitteltabellen wird der Gesamtpuringehalt außerdem nur

in mg Purin-N pro 100g Nahrungsmittel angegeben (9).

Eine genauere Kenntnis der Zusammensetzung der Nahrungspurine wäre jedoch erforderlich: wie Untersuchungen von ZÖLLNER et al. (30) ergeben haben, werden die einzelnen Purinverbindungen in sehr unterschiedlichem Ausmaß intestinal absorbiert: oral verabreichte RNS-Purine erscheinen demnach zu 50%, DNS-Purine zu 25% und Mononukleotide zu 80% als Harnsäure im Urin. Die tatsächliche Purin- bzw. "Harnsäurebelastung" des Organismus durch bestimmte Nahrungsmittel hängt folglich nicht nur vom Gesamtpuringehalt, sondern ebenso von der Zusammensetzung der enthaltenen Purinverbindungen ab. Leider finden sich in der Literatur nur wenige diesbezügliche Angaben und recht unterschiedliche Meinungen über den Anteil polymerer und monomerer Purinverbindungen am Gesamtpuringehalt von Nahrungsmitteln. Auskunft über den Anteil von RNS-Purinen am Gesamtpuringehalt einiger purinreicher Nahrungsmittel gibt Tabelle I, die anhand der Daten von CLIFFORD und STORY (3) erstellt wurde:

Tabelle I: Gesamtpuringhalt (mmol Purine/100g) bzw. "Harnsäuregehalt" (mg/100g), RNS-Gehalt (mmol Purinbasen/100g) sowie prozentualer Anteil von RNS-Purinen am Gesamtpuringehalt von verschiedenen purinreichen Nahrungsmitteln. Berechnet aus den Angaben der Purinbasenkonzentration (in mg/100g) nach saurer Hydrolyse sowie des RNS-Gehaltes (in mg/100g) von CLIFFORD und STORY (3). Der Berechnung des Puringehalts von RNS wurde ein Umrechnungsfaktor von 1,55mmol Purinbasen pro Gramm RNS zugrundegelegt.

	Gesamtpuringehalt/100g (mmol Purine)	(mg Harnsäure)	RNS-Gehalt/100g (mmol Purine)	%-Anteil von RNS-Purin am Gesamtpurin
Rindsleber	1,4	235	0,42	29,7
-niere	1,49	250	0,21	14
-herz	1,17	197	0,08	6,5
-gehirn	1,1	185	0,1	8,6
Schweineleber	2,01	338	0,4	20
Hühnerleber	1,72	289	0,62	36,3
-herz	1,51	254	0,29	19,3
Lammleber	1,04	175	0,14	13,1
-herz	1,17	197	0,08	6,6
frischer Seefisch				
Sardellen	2,72	457	0,53	19,4
Makrelen	1,29	217	0,32	24,4
Lachs	1,68	282	0,45	26,7
Sardinen	2,28	383	0,53	23,3
Dosenfisch				
Sardellen	2,12	356	0,01	0,4
Hering	2,51	422	0,13	5,1
Makrelen	1,66	279	0,19	11,4
Lachs	0,61	102	0,04	6,6
Sardinen	2,67	449	0,92	34,3
Thunfisch	0,97	163	0,01	0,8
getrocknete Hülsenfrüchte				
Erbsen	1,37	230	0,27	19,6
rote Bohnen	1,12	188	0,22	19,3
Linsen	1,57	264	0,75	47,9
kleine weiße Bohnen	1,4	235	0,47	33,8

Der Vergleich der in Tabelle I wiedergegebenen Werte für frische Seefische und Dosenfisch zeigt die Bedeutung der Zubereitung von Nahrungsmitteln für ihren Purin- und insbesondere RNS-Gehalt; neben der Entfernung von Innereien bei kleinen Fischen hat hier insbesondere wohl das Erhitzen beim Konservieren bzw. Kochen oder Braten großen Einfluß auf den RNS-Gehalt: wie LANG und SCHÄFFNER (14) gezeigt haben, kann RNS durch längeres Kochen in Wasser weitgehend hydrolysiert werden.

Wegen der geringen Resorptionsquote von DNS (s.o.) ist der Anteil der DNS-Purine am Gesamtpuringehalt von besonderem ernährungsphysiologischem Interesse. Leider sind hierzu nur wenige Literaturangaben erhältlich. Zur Orientierung seien die Daten genannt, die nach HOPPE-SEYLER und THIERFELDER (12) sowie LESLIE (15) für kleine Säugetiere ermittelt worden sind: demnach überwiegt z.B. in Leber RNS die DNS um das 2-4-fache, während sich in Thymus und Milz das umgekehrte Verhältnis findet. Im nukleinsäurearmen Muskelgewebe verhält sich RNS zu DNS wie 1:1 bis 3:1. In Nieren, Gehirn und Herzmuskel liegt annähernd gleich viel RNS und DNS vor. Nach HOPPE-SEYLER und THIERFELDER (12) ist das RNS/DNS-Verhältnis in Pflanzenzellen viel größer als in tierischen Geweben.

Wie aus Tabelle I und den soeben zitierten Angaben zum DNS-Gehalt hervorgeht, dürften in den meisten Nahrungsmitteln die monomeren Purinverbindungen die polymeren RNS- und DNS-Purine quantitativ überwiegen. Über die Zusammensetzung der monomeren Purinverbindungen in Nahrungsmitteln ist nur sehr wenig bekannt, sieht man von den zahlreichen Arbeiten über Fleisch ab: der postmortal rasch ablaufende Abbau des zunächst in großer Menge vorhandenen ATP zu IMP, Inosin und zuletzt Hypoxanthin wurde in seiner Abhängigkeit von Lagerdauer und Lagertemperatur von mehreren Autoren studiert und u.a. mit Qualität bzw. Genießbarkeit des Fleisches korreliert. So stellten POTTHAST und HAMM

(19) fest, daß der Anteil der Adeninnukleotide an den monomeren Purinen 1 Stunde nach der Schlachtung noch 88%, 6 Stunden nach der Schlachtung aber nur noch 18% betrug; in der gleichen Zeit stieg der IMP-Anteil von 8% auf 53% und der Inosinanteil von 4% auf 19% an. Nach 7 Tagen Lagerung erreichte der Inosinanteil 36% und der Hypoxanthinanteil 11,5% der monomeren Purinverbindungen.Der Anteil der monomeren Purinverbindungen am Gesamtpuringehalt wurde von den Autoren leider nicht bestimmt. Während die monomeren Purinnukleotide sehr gut intestinal absorbiert werden (s.o.), liegen über die Absorptionsquoten von Purinbasen und -nukleosiden beim Menschen keine Literaturangaben vor.

2. ZIEL DER ARBEIT

Wie in der Einleitung dargestellt, besteht ein Großteil der Nahrungspurine aus monomeren Purinverbindungen. Ihre Zusammensetzung ist nur bei wenigen Nahrungsmitteln bekannt. Schweinefleisch enthält zum Zeitpunkt des Verzehrs, d.h. in der Regel sicherlich mehr als 6 Stunden nach der Schlachtung, hauptsächlich IMP (53% der monomeren Purine) und Inosin (19 - 36%), die somit quantitativ bedeutsame Nahrungspurine darstellen. Während die Absorptionsquote des Mononukleotids IMP nach dem Ergebnis von Ernährungsversuchen mit AMP und GMP (30) in der Größenordnung von 80% liegen dürfte, ist die intestinale Absorptionsquote von Inosin bisher unbekannt. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher durch einen Ernährungsversuch an gesunden Versuchspersonen die Absorptionsquote von Inosin ermittelt: 3 Personen wurden 30 Tage lang mit einer purinfreien synthetischen Formeldiät ernährt; täglich wurde die Harnsäureausscheidung im 24-Stunden-Urin und jeden zweiten Tag die Harnsäurekonzentration im Blutplasma enzymatisch bestimmt; zur Kontrolle der vollständigen Sammlung des 24-Stunden-Urins wurde außerdem die tägliche Kreatininausscheidung gemessen. Während der ersten 10-Tage-Periode der purinfreien Ernährung sinkt durch den Wegfall der "exogenen Harnsäure" der Harnsäurespiegel im Plasma und die renale Harnsäureausscheidung auf einen konstanten Basalwert ab, der der "endogenen" Harnsäurebildung aus de-novo synthetisierten Purinen entspricht (29). Während der zweiten 10-Tage-Periode erhielten die Versuchspersonen tägliche Inosindosen von 0,5g/70kg Körpergewicht, während der dritten 10-Tage-Periode 1g Inosin/70kg Körpergewicht. Durch diese Purinzufuhr steigen Serumharnsäurespiegel und renale Harnsäureausscheidung an und erreichen nach einigen Tagen jeweils wieder einen Gleichgewichtswert. Die Differenz zwischen dem Gleichgewichtswert der renalen

Harnsäureausscheidung am Ende der ersten purinfreien Periode und den Werten am Ende der Perioden mit Inosinzulage entspricht der absorbierten Inosinmenge. Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, eine exakte Analyse des Puringehalts von Fleisch durchzuführen, um den Anteil von Inosin am Gesamtpuringehalt festzustellen. Analysiert wurde Muskelfleisch vom Schlegel von Schwein, Kalb, Rind und Huhn; die monomeren Purine wurden hierbei im Säureextrakt mittels Anionenaustauscher- (Nukleotide) bzw. Umkehrphasen- (Nukleoside und Basen) Hochdruckflüssigkeitschromatographie gemessen, der RNS- und DNS-Puringehalt durch Ribose- bzw. Desoxyribosebestimmung nach stufenweiser Partialhydrolyse ermittelt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. DURCHFÜHRUNG DES ERNÄHRUNGSVERSUCHS

Der Ernährungsversuch war in drei Abschnitte eingeteilt. Nach einer Vorperiode von zwei Tagen mit normaler Ernährung erhielten die Versuchspersonen vom ersten Versuchstag an eine purinfreie, isokalorische flüssige Formeldiät. Die Testsubstanz Inosin wurde in der Dosis von 0,5g/70kg Körpergewicht (= KG) ab Tag 11 verabreicht und ab Tag 21 auf 1g/70kg KG erhöht.

		0,5g Inosin/70kgKG	1g Inosin/ 70kg KG
Vorperiode mit normaler Kost	Purinfreie isokalorische Formeldiät		
Versuchstage	1 - 11	11 - 20	21 - 30

Abb. I: Ablauf des Ernährungsversuches

3.1.1. Zusammensetzung der Diät

Der individuelle Kalorienbedarf wurde anteilmäßig durch 55% Kohlehydrate (Maltodextrin®, Maizena, Hamburg), 30% Fett (Livio® Speiseöl, Union Deutsche Lebensmittelwerke, Hamburg) und

15% Protein (Magermilchsprühpulver, Bayerische Milchindustrie, Landshut) gedeckt. Elektrolytsubstitution erfolgte mit 5g NaCl/Tag und 3g KCl/Tag, die beigemengt wurden. Je nach Menge der Trockensubstanzen wurden 500 - 700ml Wasser zugegeben, das Ganze im Mixer verquirlt und in drei Portionstüten abgefüllt. Die Zubereitung des Gemisches erfolgte täglich frisch. An Getränken waren nur Mineralwasser, sowie Kaffee und Tee ohne Zusätze in beliebiger Menge erlaubt. Als einzige Geschmacksadjuvantien durften Zimt, Vanillepulver und Na-Cyclamat verwendet werden. Außerdem durfte täglich ein ca. 150g schwerer Apfel verzehrt werden. Vitamine wurden in Form eines Multivitaminpräparates (Multibionta forte®, Merck, Darmstadt) alle zwei Tage zugeführt. Während der gesamten Versuchsdauer waren Sport und Alkoholgenuß verboten, Medikamente durften nicht eingenommen werden.

3.1.2. Testsubstanz

Während der letzten beiden Versuchsabschnitte wurde Inosin (Boehringer, Mannheim) täglich ausgehändigt. Die entsprechenden Mengen - 0,5g bzw. 1g Inosin/70kg KG - wurden für jeden Versuchsteilnehmer abgewogen (Analysenwaage H 54, Mettler, Gießen) und auf drei bzw. sechs Oblatenkapseln (Kuechle, Günzburg) verteilt. Die Probanden nahmen die tägliche Dosis in drei Portionen mit den Mahlzeiten zu sich.

3.1.3. Kalorienberechnung

Mit Hilfe des Nomogramms von DU BOIS (1) wurde aus Größe und Gewicht jeder Versuchsperson die Körperoberfläche bestimmt. Einer weiteren Tabelle von BOOTHBY (2) wurden die Werte für den Grundumsatz entnommen. Alter und Geschlecht der Versuchspersonen

finden darin Berücksichtigung. Nach ZÖLLNER (27) wurden die Angaben für den Grundumsatz entsprechend der Tätigkeit der Probanden (Studenten) mit dem Faktor 1,6 multipliziert. Dies entspricht dem Arbeitsumsatz bzw. deckt den Kalorienbedarf bei leichter körperlicher Tätigkeit. Um Gewichtskonstanz zu gewährleisten, wurden die Versuchspersonen täglich im Labor gewogen. Bei größeren Gewichtsschwankungen wäre dieser Faktor bzw. die Kalorienzufuhr entsprechend zu ändern gewesen.

$$(\text{Körpergewicht in kg})^{0,245} \times (\text{Größe in cm})^{0,275} \times 71,84 = \text{KÖRPEROBERFLÄCHE in cm}^2$$

$$\text{Körperoberfläche in cm}^2 \times A \times 24 = \text{GRUNDUMSATZ in kcal/24 Std.}$$

A berücksichtigt Alter und Geschlecht.

$$\text{Grundumsatz in kcal} \times 1,6 = \text{ARBEITSUMSATZ in kcal/24 Std.}$$

3.1.4. Das Versuchspersonenkollektiv

bestand aus 3 gesunden männlichen Teilnehmern im Alter von 22, 23 und 24 Jahren. Vor Beginn der Untersuchung wurde bei allen Versuchspersonen Blutbild, GOT, GPT, Bilirubin ges., AP, Elektrolyte, FE, HS-N, HS und Kreatinin bestimmt (Zentrallabor der Poliklinik, Universität München). Sämtliche Werte lagen im Normbereich.

Nachstehend eine Aufstellung über Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und den daraus errechneten Kalorienbedarf der einzelnen Versuchspersonen.

Tabelle II: ANGABEN ZU DEN VERSUCHSPERSONEN

Name	Alter	Größe (cm)	Gewicht (kg)	KCAL Bedarf	Inosindosis (mg)	Inosindosis berechnet als HS (mg)
E	24	180	79	3100	564/1129	352/705
M	23	194	78	3350	557/1114	348/696
Z	22	178	75	3000	536/1071	335/670

3.2. MESSUNG DES PLASMAHARNSÄURESPIEGELS UND DER RENALEN HARNSÄUREAUSSCHEIDUNG

3.2.1. Gewinnung von Blutplasma

Es wurden jeden 2. Tag um 9 Uhr morgens 5ml venöses Blut aus der fossa antecubitalis bzw. dem Handrücken entnommen. Die Probanden befanden sich in nüchternem Zustand. Das Blut wurde in heparinisierte (Thrombophob®, Nordmark, Hamburg) Reagenzgläser gegeben. Nach dem Zentrifugieren in einer Heraeus-Christ Becher-Kühlzentrifuge (Universal Junior II KS mit 2500 rpm $\triangleq$ 600 x g für 10 Minuten) wurde die Plasmafraktion abpipettiert und bei -20°C bis zur Durchführung der Bestimmungen tiefgefroren.

Zu den Messungen wurden die Proben bei 37°C im Wasserbad aufgetaut.

3.2.2. Sammeln und Aufarbeiten des 24-Stunden-Urins

Der 24-Stunden-Urin wurde in 1-l Plastikflaschen, die jeweils mit 3ml Toluol versetzt worden waren, gesammelt und täglich abgeliefert. Der Morgenurin des 1. Tages wurde verworfen, der des letzten Tages dafür miteinbezogen. Es bestand die Anweisung, so viel zu trinken, daß eine tägliche Harnproduktion von mindestens 1 Liter zustande käme. Über Nacht wurden die Urinflaschen im Kühlschrank aufbewahrt. Wie Toluol hemmt diese Maßnahme das Bakterienwachstum im Urin und damit Veränderungen der Harnsäuremenge.

In einem 2-l Meßzylinder wurde der 24-Stunden-Urin eines jeden Probanden zusammengeschüttet, kräftig durchgemischt, das Volumen bestimmt und eine aliquote Fraktion von 20ml in einem Rollrandglas bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C tiefgefroren. Der Auftauprozeß entsprach dem des Serums. Jede Probe wurde kräftig geschüttelt, um eventuell auskristallisierte HS aufzulösen und sodann filtriert (Papierfilter Selecta, Schleicher und Schüll), um bei der Photometrie störende Trübungen auszuschließen.

3.2.3. Harnsäurebestimmung

Prinzip

a. Die Harnsäurebestimmungen erfolgten mit der von ZÖLLNER (28) weiterentwickelten Methode von PRAETORIUS und POULSEN (20). Harnsäure besitzt die physikalische Eigenschaft, Licht im UV-Bereich maximal bei 293nm zu absorbieren. Das Enzym Uricase baut Harnsäure zu Allantoin ab, welches ein anderes Absorptionsspektrum besitzt und bei 293nm praktisch keine Absorption aufweist. Der photometrisch meßbare Extinktionsabfall einer Harnsäure enthaltenden Probe nach Inkubation mit Uricase ist der Harnsäurekonzentration proportional. Zu Beginn der Messungen wurde die Linearität der Methode mit einer Standardkurve überprüft (Abb. II).

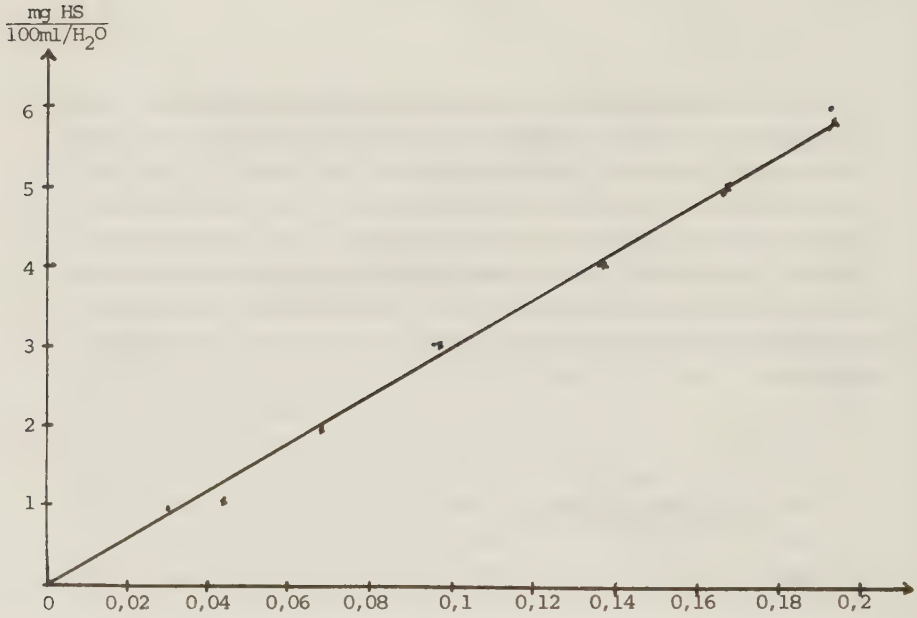

Abb. II: Eichkurve zur Bestimmung der Harnsäurekonzentration nach der Methode von Zöllner (28)

b. Reagentien

- Enzympräparat: Uricase 75U/Ampulle (Loevens Kemiske Fabrik, Ballerup, Dänemark)
- Uricase-Gebrauchslösung: Vor jeder Meßreihe wurde die Uricase-Tablette der Ampulle vollständig entnommen und in 25ml Puffer-Gebrauchslösung (s. u.) aufgelöst. Die Eigenextinktion dieser Lösungen lag zwischen 0,024 und 0,031 und wurde bei den Berechnungen berücksichtigt.
- Glycinpuffer-Stammlösung 2/3M, pH 9,3 (Apotheke Poliklinik der Universität München). Zur Haltbarmachung wurde die Lösung mit etwas Chloroform versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.
- Glycinpuffer-Gebrauchslösung: Mit aqua bidest 1:10 verdünnte Stammlösung.

c. Testansätze

Für die Harnsäurebestimmung wurde das Plasma im Verhältnis 1:25 mit Glycinpuffer-Gebrauchslösung verdünnt, Urin 1:125; die Verdünnungen wurden unter Verwendung von 25- bzw. 125ml Meßkolben hergestellt.

Folgende Ansätze wurden zur Photometrie vorbereitet:

- Eigenextinktion E_o des Enzyms:
  a) 2ml Puffer-Gebrauchslösung + 1ml Uricase-Gebrauchslösung
  gemessen gegen
  b) 3ml Puffer-Gebrauchslösung

- Extinktionsabfall im Plasma bzw. Urin:
  c) 2ml verdünntes Plasma bzw. Urin + 1ml Puffer-Gebrauchslösung
  gemessen gegen
  d) 2ml verdünntes Plasma bzw. Urin + 1ml Uricase-Gebrauchslösung

Die Uricasereaktion ist nach 45 Minuten abgeschlossen. Um das tatsächliche Reaktionsende zu überprüfen, wurden neben den Standard-Doppelbestimmungen zahlreiche Kontrollmessungen nach 60 und 90 Minuten Inkubationsdauer durchgeführt.
Zu den Messungen wurde ein Spektralphotometer der Firma Zeiss benützt und bei 293nm mit Quarzküvetten von 10mm Schichtdicke gearbeitet. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

d. Berechnung der Harnsäurekonzentration in Plasma und Urin

Die Extinktion einer Harnsäurelösung von 1µg/ml beträgt in der 10mm Quarzküvette 0,075.

Die Harnsäurekonzentration verhält sich damit wie

$$\frac{E_0+E\ HS\mu g/ml}{0,075}$$

und unter Berücksichtigung der Verdünnungen

$$cHS_{Pl} = \frac{(E_0+E_{HS}) \times 3 \times 25 \times 100}{0,075 \times 2 \times 1000}$$

$$cHS_{Plasma} = (E_0+E_{HS}) \times 50 \ (mg/100ml)$$

$$cHS_{U} = \frac{(E_0+E_{HS}) \times 3 \times 125 \times 100}{0,075 \times 2 \times 1000}$$

$$cHS_{Urin} = (E_0+E_{HS}) \times 250 \ (mg/100ml)$$

3.2.4. Bestimmung der renalen Kreatininausscheidung

Die Bestimmung der renalen Kreatininausscheidung wurde vom Zentrallabor der Poliklinik nach der Methode von JAFFÉ durchgeführt.

3.3. BESTIMMUNG DES PURINGEHALTS VON FLEISCH

3.3.1. Herstellung von Säureextrakten aus Fleisch (nach VOLKIN u. COHN (24), sowie OGUR u. ROSEN (16))

Handelsübliches Schweine-, Kalb-, Rind- sowie tiefgefrorenes Hühnerfleisch vom Schlegel wurde in einer Metzgerei besorgt und bis zur Aufarbeitung am folgenden Tag bei 4°C aufbewahrt. Ein kleines Stück Fleisch ohne sichtbares Fett- und Bindegewebe wurde auf Filterpapier kleingeschnitten und getrocknet; eine Portion von ca. 300mg wurde sodann auf einer Anlaysenwaage (Mettler H 54) genau ausgewogen, in einen kleinen Potter-Homogenisator überführt und nach Zusetzen von 1ml destilliertem Wasser mit einem Teflon-Kolben bei 3000 Umdrehungen pro Minute und Eiswasserkühlung ca. 5 Minuten lang homogenisiert. Das Homogenat wurde sodann in ein Reagenzglas überführt und die im Potter verbliebenen Rückstände mit 0,5ml destilliertem Wasser nachhomogenisiert. Dieses zweite Homogenat wurde mit dem ersten vereinigt. Nun wurden 3,75ml kalte 10%ige Trichloressigsäure (10g/100ml) zugesetzt und das Gemisch auf dem Vortex-Mixer kräftig geschüttelt. Durch 10-minütige Zentrifugation in einer Heraeus-Christ-Kühlzentrifuge (Universal Junior II KS) bei 4°C und 3000rpm entsprechend 900 x g wurde sodann das Pellet mit den säureunlöslichen Nukleinsäuren und Proteinen vom Überstand mit den monomeren

Purinen getrennt. Der Überstand wurde nun in ein 10ml Meßkölbchen abgegossen und das Pellet nochmals mit 2,5ml 10%iger Trichloressigsäure aufgeschüttelt. Der nach erneuter Zentrifugation erhaltene Überstand wurde mit dem ersten vereinigt; das Kölbchen wurde sodann mit destilliertem Wasser bis zur 10ml-Marke aufgefüllt; nach gründlichem Mischen wurden hiervon je 0,75ml in zwei Eppendorf-Becher pipettiert und mit wassergesättigtem Diäthyläther viermal extrahiert, wodurch ein pH-Wert von 3 erreicht wird (18). Bis zur Analyse durch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurden die Proben sodann bei -20°C eingefroren. Das säureunlösliche Pellet wurde nun in 3ml 1n Perchlorsäure suspendiert und 15 Stunden bei 4°C zur Extraktion der RNS-Purin-Ribose aufbewahrt. Anschließend wurde das Gemisch geschüttelt und wie oben abzentrifugiert; der Überstand wurde wiederum in ein 10ml-Meßkölbchen abgegossen und das Pellet noch zweimal mit je 3ml Perchlorsäure nachgewaschen; die vereinigten Überstände wurden sodann wiederum mit 1n Perchlorsäure auf 10ml aufgefüllt.

Zur Extraktion der DNS-Purin-Desoxyribose wurde das verbliebene Pellet nun in 4,5ml 1n Perchlorsäure suspendiert und 30 Minuten lang im Wasserbad auf 80°C erhitzt. Nach dem bei Raumtemperatur durchgeführten Abzentrifugieren wurde der Überstand wiederum in ein 10ml-Meßkölbchen abgegossen und die Extraktion des Pellets in der gleichen Weise wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden wieder mit mit 1n Perchlorsäure auf 10ml aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2. Durchführung der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Messungen

Die monomeren Purinverbindungen im Trichloressigsäureextrakt wurden hochdruckflüssigkeitschromatographisch bestimmt. Das hierzu verwendete Gerät Typ 1084 B von Hewlett-Packard war mit zwei Pumpen, einem automatischen Injektor und einem photometrischen Detektor mit variabler Wellenlänge ausgestattet und wurde mit zwei unterschiedlichen Trennsystemen betrieben:

a. das Umkehrphasensystem
(nach WEBSTER et al. (26)) trennt Basen und Nukleoside an einer stationären Phase von Kohlenwasserstoffketten, die an Kieselgelpartikel gebunden sind. Bei Verwendung einer stationären Phase mit einer Kohlenwasserstoffkettenlänge von 8 C-Atomen können die Purinbasen und -nukleoside isokratisch mit einem Phosphatpuffer eluiert werden; die Nukleotide haben in diesem System sehr kurze Retentionszeiten und werden infolgedessen nicht ausreichend aufgetrennt. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde eine Chrompack RP-8 Säule mit 25cm Länge und 4,6mm innerem Durchmesser sowie unregelmäßiger Partikelform und einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,01mm verwendet. Die isokratische Elution erfolgte mit einem Kaliumphosphatpuffer mit der Konzentration von 1g/l und einem pH-Wert von 2,3; die Flußrate betrug 1ml/Min., das Injektionsvolumen 0,02ml; das Eluat wurde im Durchflußphotometer bei einer Wellenlänge von 254nm und einer Attenuation von 2^5 photometriert.

b. das Anionenaustauschersystem
(nach PERRETT (18)) trennt Nukleotide durch Elution mit einem linearen Kaliumphosphat-Konzentrations- und -pH-Gradienten, der in 20 Minuten von 1g/l Kaliumphosphat pH 2,5 (Puffer A) zu 100g/l Kaliumphosphat pH 3,5 (Puffer B) führt; die hohe Salzkonzentration von Puffer B erfordert zur Vermeidung ei-

nes stärkeren Grundlinienanstiegs die Verwendung von Kaliumdihydrogenphosphat Merck Suprapur und konzentrierter Phosphorsäure Merck Suprapur, mit der der pH-Wert am pH-Meter der Firma Radiometer, Kopenhagen, eingestellt wurde. Hat der Gradient nach 20 Minuten 100% Puffer B erreicht, wird die Elution noch 10 Minuten mit diesem Puffer fortgesetzt, bevor das System in einem linearen 5-Minuten-Gradienten wieder in 100% Puffer A gebracht wird; nach weiteren 10 Minuten Elution mit Puffer A ist das System für die nächste Analyse äquilibriert. Die Flußrate beträgt 1ml/Min. Die Trennsäule mit einer Länge von 25cm und einem inneren Durchmesser von 4,6mm enthält den schwachen Anionenaustauscher APS-Hypersil in einer Korngröße von 0,005mm und wurde von der Firma Bischoff Analysentechnik, Leonberg, geliefert. Das Injektionsvolumen betrug 0,05ml. Die Chromatogramme wurden bei 254 und 280nm zur Sicherung der Peakidentifizierung registriert. Die Attenuation war auf 2^5 eingestellt.

Vor der Injektion der Extrakte wurden Mischungen von Standardlösungen chromatographiert, deren Konzentrationen photometrisch bestimmt wurden:

a. Standardmischung für das Umkehrphasensystem:
Aufgrund der Ergebnisse von POTTHAST und HAMM (19) sollten mit dem Umkehrphasensystem Hypoxanthin und Inosin gemessen werden; um Überlagerungen auszuschließen wurden der Standardmischung neben diesen beiden Substanzen noch ADP, IMP, Harnsäure und Xanthin zugesetzt. Hierzu wurden zunächst Stammlösungen mit einer Konzentration von 2mg/10ml H_2O für Inosin, ADP und IMP, 2mg/20ml H_2O für Hypoxanthin, sowie 1mg/20ml H_2O für Harnsäure und Xanthin hergestellt. Jeweils 0,2ml der Stammlösungen von Inosin, IMP und ADP wurden mit jeweils 0,5ml der Stammlösungen von Hypoxanthin, Harnsäure und Xanthin zur Standardmischung vereinigt. Die exakte Kon-

zentration der Stammlösungen von Hypoxanthin und Inosin wurde photometrisch bestimmt: von der Hypoxanthin- und Inosinstammlösung wurden jeweils 3 Verdünnungen 1:20 mit 0,1M Natriumphosphatpuffer pH 6 hergestellt und gegen einen entsprechenden Leerwert aus Wasser und Puffer bei 249,5 bzw. 248,5nm in 1cm Quarz-Küvetten im Beckman-Photometer Typ 25 photometriert. Der gemittelte und mit 20 multiplizierte Extinktionswert wurde sodann durch den molaren Extinktionskoeffizienten von Hypoxanthin (10700 Liter/mol x cm) bzw. Inosin (12300 Liter/mol x cm) dividiert, wodurch die Konzentration der Stammlösungen in mol/l erhalten wurde.

b. Standardmischung für das Anionenaustauschersystem:
nach den Angaben von POTTHAST und HAMM (19) waren mit dem Anionenaustauschersystem die Nukleotide AMP, IMP, ADP und ATP zu bestimmen; um Überlagerungen auszuschließen, wurden der Standardmischung neben diesen Substanzen noch NAD, UDP-Glucose, GDP und GTP zugesetzt. Die Konzentrationen der Stammlösungen, deren Anteil an der Standardmischung sowie die Daten zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen von AMP, IMP, ADP und ATP sind in der folgenden Tabelle III zusammengestellt; die photometrische Konzentrationsbestimmung wurde wie oben dargestellt vorgenommen, die Verdünnung mit 0,1M Natriumphosphatpuffer erfolgte jedoch im Verhältnis 1:11.

Tabelle III: STANDARDMISCHUNG FÜR DAS ANIONENAUSTAUSCHERSYSTEM:

Substanz	Stammlösung (mg/100ml)	ml in Standard-Mischung	Photometrische Konz.-Bestimmung pH	Wellenlänge	Ext.-Koef.
AMP	10	0,25	2	257 nm	15000
NAD	7	0,3			
IMP	17	0,5	6	248 nm	12200
UDP-Glucose	17	0,25			
ADP	7	0,25	2	257 nm	15000
GDP	34	0,1			
ATP	10,5	0,25	2	257 nm	14700
GTP	34	0,1			

Die nach den Mengenangaben der Tabelle angefertigte Standardmischung hat ein Volumen von 2,0ml; vor Verwendung im HPLC wurde sie noch mit 3ml H_2O verdünnt.

Die Extinktionskoeffizienten für Hypoxanthin, Inosin, AMP, IMP, ADP und ATP wurden dem Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Herausgeber G.D.Fasman, 3. Auflage, CRC Press Cleveland, 1975, entnommen.

Alle Standardsubstanzen wurden von Sigma Chemie, München, bezogen.

3.3.3. Bestimmung des RNS-Purin-Ribose-Gehalts (nach VOLKIN und COHN (24))

Durch die bei 4°C durchgeführte 15-stündige Extraktion mit 1n Perchlorsäure werden die Purinnukleotide der RNS hydrolysiert und damit ihr Riboseanteil freigesetzt, während die stabileren Pyrimidinnukleotide und die DNS unverändert bleiben. Die Ribosekonzentration wurde mit der Orcinolreaktion photometrisch bestimmt: zunächst wurde eine Stammlösung mit 4g Orcinol und 2,7g Eisen-III-Ammonium-Sulfat in 100ml destilliertem Wasser hergestellt und bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden 12,5ml dieser Stammlösung zu 207,5ml konzentrierter HCl gegeben und mit destilliertem Wasser auf 250ml aufgefüllt. 6ml dieser Gebrauchslösung wurden in einem Reagenzglas mit 2ml des 4°C-Perchlorsäureextrakts (s.o.) bzw. 2ml 1n Perchlorsäure für den Leerwert oder 2ml Inosinlösungen mit einem Ribosegehalt von 0,0015 - 0,015mg/ml zur Erstellung der Eichkurve (s.u.) versetzt. Alle Proben wurden doppelt hergestellt und sodann 20 Minuten in einem kochenden Wasserbad unverschlossen erhitzt. Nach Abkühlen der Proben wurde ihre Extinktion bei 660nm in 1cm-Küvetten in einem Spektralphotometer Typ 25 der Firma Beckman gegen den Leerwert abgelesen. Die Purin-Ribose-Konzentration der Fleischextrakte wurde sodann aus der Eichkurve errechnet.

Erstellung der Ribose-Eichkurve mit Inosin:

Die Erstellung der Ribose-Eichkurve mit Inosin hat den Vorteil, daß der Ribosegehalt durch photometrische Bestimmung der Inosinkonzentration ermittelt werden kann. Man wiegt ca. 6,7mg Inosin in einen 250ml Meßkolben ein und füllt mit 1n Perchlorsäure auf. Nach vollständiger Lösung des Inosins versetzt man in 3 Reagenzgläsern je 1ml der Inosinlösung mit 1ml 1n Perchlorsäure und liest die Extinktion am Beckman-Photometer unter Verwendung von 1cm-Quarzküvetten bei 251nm gegen 1n Perchlorsäure ab; zur Konzentrationsberechnung wird ein Extinktionskoeffizient von 10900 verwendet (Wert für pH 0). Von der Inosinstammlösung

stellt man eine Verdünnungsreihe her, indem man in jeweils zwei 10ml-Meßkölbchen 1, 2, 4, 6 und 8ml pipettiert und mit 1n Perchlorsäure auf 10ml auffüllt.

3.3.4. Bestimmung des DNS-Purin-Desoxyribose-Gehalts (nach GILES und MYERS (7))

Durch die bei 80°C durchgeführte 30-minütige Extraktion mit 1n Perchlorsäure werden die Purinnukleotide der DNS hydrolysiert und damit ihr Desoxyriboseanteil freigesetzt, der mit der Diphenylamin-Methode bestimmt wird: zu 2ml des 80°C-Perchlorsäureextrakts werden 2ml einer 4%igen (Gew./Vol.) Diphenylaminlösung in Eisessig und dann 0,1ml einer wässrigen Acetaldehydlösung mit 1,6mg/ml (160mg oder 0,205ml auf 100ml H_2O) Acetaldehyd gegeben.

Für die Standardkurve wurden 10,3mg d-Inosin in 250ml 1n Perchlorsäure aufgelöst. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden 3 Proben 1:3 mit 1n Perchlorsäure verdünnt und die Extinktion in 1cm Quarzküvetten im Beckman-Photometer bei 251nm gegen 1n Perchlorsäure abgelesen; der Konzentrationsberechnung wurde ein Extinktionskoeffizient von 10900 zugrundegelegt (Wert für Inosin bei pH 0). Von dieser d-Inosin-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem in jeweils zwei 10ml-Meßkölbchen 1, 2, 4, 6 und 8ml pipettiert und mit 1n Perchlorsäure auf 10ml aufgegefüllt wurden. Als Leerwert wurden 2ml 1n Perchlorsäure verwendet. Die d-Inosin-Bestimmung in den Extrakten wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Zugabe der Diphenylamin- und Acetaldehydlösuung (s.o.) zu Extrakten, Standardverdünnungen und Leerwert wurden die Proben über Nacht bei 30°C im Wasserbad inkubiert und dann in 1cm-Küvetten im Beckman-Photometer bei 595nm gegen den Leerwert photometriert. Die Konzentration von d-Inosin in den Extrakten wurde sodann aus der Standardkurve berechnet.

4. E R G E B N I S S E

4.1. ERGEBNISSE DES ERNÄHRUNGSVERSUCHS

Die Ergebnisse des Ernährungsversuchs werden für die einzelnen Versuchspersonen zunächst getrennt dargestellt:

4.1.1. Versuchsperson E:

Die während des Ernährungsversuchs zweitägig bestimmte Harnsäurekonzentration im Plasma sowie die tägliche Harnsäure- und Kreatininausscheidung im Urin sind ebenso wie das täglich Urinvolumen in Tabelle IV aufgeführt; der Verlauf der Harnsäurekonzentration im Plasma sowie der renalen Harnsäureausscheidung sind außerdem in Abb. III dargestellt.

Unter Normalkost lag die renale Harnsäureausscheidung von Versuchsperson E bei 555mg/die, die Plasmaharnsäurekonzentration bei 4,8mg/100ml (Durchschnitt Vorperiode + Tag 1). Während der ersten 5 Tage der purinfreien Ernährung nahm die renale Harnsäureausscheidung ab und erreichte von Tag 6 - 9 einen Gleichgewichtswert von durchschnittlich 263mg/die (251-275mg/die); die Harnsäureausscheidung von Tag 10 weicht deutlich von diesem Gleichgewichtswert ab und wurde daher nicht in dessen Berechnung einbezogen.
Nachdem die Harnsäurekonzentration im Plasma ihren niedrigsten Wert erst am Tag 11 erreichte (3,25mg/100ml) und sich aus der Harnsäurekonzentrationskurve von Plasma noch kein Gleichgewichtswert für die purinfreie Diät ablesen läßt, muß man annehmen, daß die renale Harnsäureausscheidung unter Forstsetzung der purinfreien Diät sogar noch unter den errechneten Gleichgewichtswert von 263mg/die hätte absinken können.

Unter Zulage einer täglichen Inosindosis von 564mg (Tag 11 - 20) entsprechend einer präformierten Harnsäuremenge von 352mg stieg die Harnsäurekonzentration im Plasma wieder deutlich an und erreichte ab Tag 17 einen Gleichgewichtswert von 4,55mg/100ml (Durchschnitt der Werte von Tag 17, 19 und 21). Die renale Harnsäureausscheidung läßt demgegenüber keinen eindeutigen Gleichgewichtswert erkennen, da die Werte der Tage 17 - 20 eine starke Schwankung aufweisen (327 - 529mg); nachdem an Tag 20 die Kreatininausscheidung im Urin deutlich unter dem Wert der vorausgehenden Tage lag, wurde Tag 20 nicht in die Berechnung des Durchschnittswerts einbezogen; dieser beträgt für Tag 16 - 19 441,5mg (350 - 529). Gegenüber der vorausgehenden purinfreien Periode (Tag 1 - 10) bedeutet dies einen Anstieg der renalen Harnsäureausscheidung um 178,5mg entsprechend einer Absorptionsquote von Inosin von 50,7%.

Die Zulage einer täglichen Inosindosis von 1129mg (Tag 21 - 30) entsprechend einer präformierten Harnsäuremenge von 705mg führte zu einem weiteren Anstieg der Harnsäurekonzentration im Plasma auf einen Wert von zuletzt 5,3mg/100ml (Mittelwert der Tage 29 und 31).

Die renale Harnsäureausscheidung zeigt am Ende dieser Periode wiederum stark schwankende Werte (505 - 857mg), ein Gleichgewichtswert läßt sich aus der Kurve nicht ablesen. Der Durchschnittswert der Tage 25 - 30 beträgt 689mg. Werden die Tage 25 und 30 wegen ihres stärker abweichenden Kreatininwerts nicht berücksichtigt und nur die Tage 26 - 29 zur Durchschnittsberechnung herangezogen, so ergibt sich ein Durchschnitt von 627mg. Im ersten Fall beträgt die Differenz zur purinfreien Periode (Tag 1 - 10) 426mg entsprechend einer Inosinabsorptionsquote von 60,4%; im zweiten Fall beträgt die Differenz 364mg entsprechend einer Absorptionsquote von 51,6%.

Tabelle IV: Harnsäurekonzentration im Plasma, renale Harnsäure- und Kreatininausscheidung, sowie Urinvolumen von Versuchsperson E

	Tag	HS Plasma mg/100ml	RHSA mg/die	gK/die	Urinvolumen ml/die
Vorperiode		5,08	576	1,65	1000
		4,55	535	1,63	860
	1	4,73	469	1,49	1240
	2		354	1,48	800
	3	4,27	342	1,57	1060
purinfreie	4		345	1,52	1270
Diät	5	4,15	294	1.20	920
	6		275	1,59	860
	7	3,88	251	1,68	800
	8		274	1,31	820
	9	3,75	251	1,40	1080
	10		339	1,73	910
	11	3,25	353	1,47	950
	12		424	1,44	900
purinfreie	13	4,50	366	1,15	820
Diät + 564mg	14		383	1,04	800
Inosin/die	15	4,90	414	1,31	870
(entspr.	16		446	1,29	780
352mg HS)	17	4,55	441	1,71	900
	18		350	1,42	790
	19	4,70	529	1,52	780
	20		327	1,01	780
	21	4,40	503	1,20	600
	22		685	1,43	1100
purinfreie	23	5,20	645	1,53	900
Diät + 1129mg	24		650	1,26	970
Inosin/die	25	5,15	772	1,27	1100
(entspr.	26		505	0,82	860
705mg HS)	27	5,65	651	0,98	980
	28		606	0,90	860
	29	5,38	745	1,06	920
	30		857	1,31	900
	31	5,24			

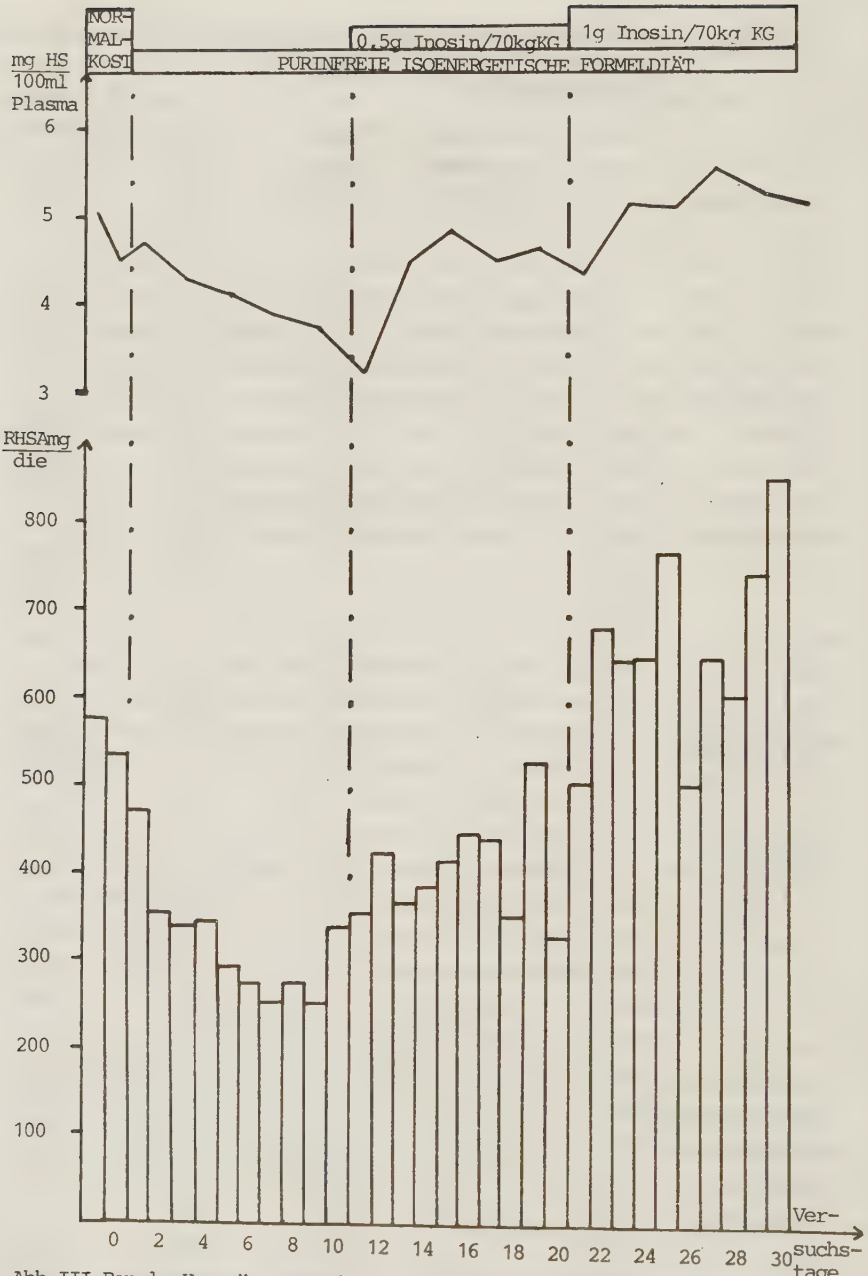

Abb.III: Renale Harnsäureausscheidung und Plasmaharnsäurekonzentration von Versuchsperson E

4.1.2. Versuchsperson M:

Die Meßergebnisse von Versuchsperson M sind in Tabelle V wiedergegeben und in Abb. IV dargestellt.
Unter Normalkost lag die renale Harnsäureausscheidung von Versuchsperson M bei 469mg/die, die Plasmaharnsäurekonzentration bei 5,09mg/100ml (Durchschnitt Vorperiode + Tag 1). Die purinfreie Ernährung (Tag 1 - 10) bewirkte einen Rückgang der Plasmaharnsäurekonzentration auf 3,76mg/100ml (Mittelwert der Tage 9 und 11); die renale Harnsäureausscheidung erreichte bereits am 4. Tag ihren niedrigsten Wert von 284mg/die und stieg dann bis zum Ende der Periode wieder leicht an, mit einem Maximum von 409mg am 9. Tag. Eine ausgesprochene Gleichgewichtseinstellung wurde folglich nicht erreicht. Für die Berechnung der Absorptionsquote von Inosin wurde die durchschnittliche Harnsäureausscheidung der Tage 4 - 10 in Höhe von 341,6mg (284 - 409mg) herangezogen.

Während der 10-tägigen Zulage von 557mg Inosin/die (Tag 11 - 20) ergaben sich sehr stark schwankende Werte, sodaß weder die Berechnung eines Gleichgewichtsharnsäurespiegels im Plasma noch einer Gleichgewichtsharnsäureausscheidung im Urin möglich ist. Bei Berücksichtigung der Kreatininausscheidung im Urin könnte höchstens Tag 15 wegen einer im Vergleich mit den benachbarten Tagen deutlich erniedrigten Kreatininausscheidung aus der Gleichgewichtsberechnung eliminiert werden; die zwei weiteren Tage mit ähnlich niedriger Harnsäureausscheidung (Tag 17 und 18) unterscheiden sich jedoch in ihrer Kreatininausscheidung nur wenig von den beide folgenden Tagen (Tag 19 und 20) und können daher nicht unberücksichtigt bleiben.

Unter der täglichen Gabe von 1114mg Inosin (Tag 20 - 30) entsprechend einer präformierten Harnsäuremenge von 696mg stellte sich ab Tag 25 ein stabiler Harnsäurespiegel im Plasma von

4,96mg/100ml (4,91 - 4,98mg/100ml) ein; die renale Harnsäureausscheidung erreichte ab Tag 24 ein relativ stabiles Gleichgewicht, das nur am Tag 27 durch einen deutlich erniedrigten Wert unterbrochen wird. Läßt man diesen Tag unberücksichtigt, so ergibt sich ein Gleichgewichtswert für die renale Harnsäureausscheidung von 684mg/die (658 - 713mg). Gegenüber der purinfreien Periode (Tag 1 - 10) bedeutet dies einen Anstieg der renalen Harnsäureausscheidung um 342,5mg/die entsprechend einer Inosinabsorptionsquote von 49,2%.

Tabelle V: Harnsäurekonzentration im Plasma, renale Harnsäure- und Kreatininausscheidung, sowie Urinvolumen von Versuchsperson M

	Tag	HS Plasma mg/100ml	RHSA mg/die	gK/die	Urinvolumen ml/die
Vorperiode		5,12	489	0,90	1200
		5,16	448	0,81	1080
	1	4,99	395	1,06	1180
	2		367	1,16	1360
	3	4,43	313	0,75	940
purinfreie	4		284	1,05	1620
Diät	5	4,45	334	0,90	1060
	6		308	0,92	1220
	7	4,18	372	1,24	1240
	8		339	1,08	1140
	9	3,63	409	1,10	1220
	10		345	1,08	1200
	11	3,89	597	1,24	1080
	12		555	1,15	1000
purinfreie	13	4,40	414	0,88	980
Diät + 557mg	14		547	1,07	1420
Inosin/die	15	5,45	280	0,53	820
(entspr.	16		568	1,03	1720
348mg HS)	17	4,52	288	0,72	960
	18		275	0,71	940
	19	4,66	474	0,74	1240
	20		563	0,83	1390
	21	4,93	355	0,54	1080
	22		532	0,82	1820
purinfreie	23	5,49	405	0,72	1200
Diät + 1114mg	24		658	1,01	2250
Inosin/die	25	4,91	708	1,20	1840
(entspr.	26		667	1,05	2340
696mg HS)	27	4,98	457	0,70	1400
	28		693	0,83	1660
	29	4,98	713	0,86	1440
	30		666	0,81	1480
	31	4,95			

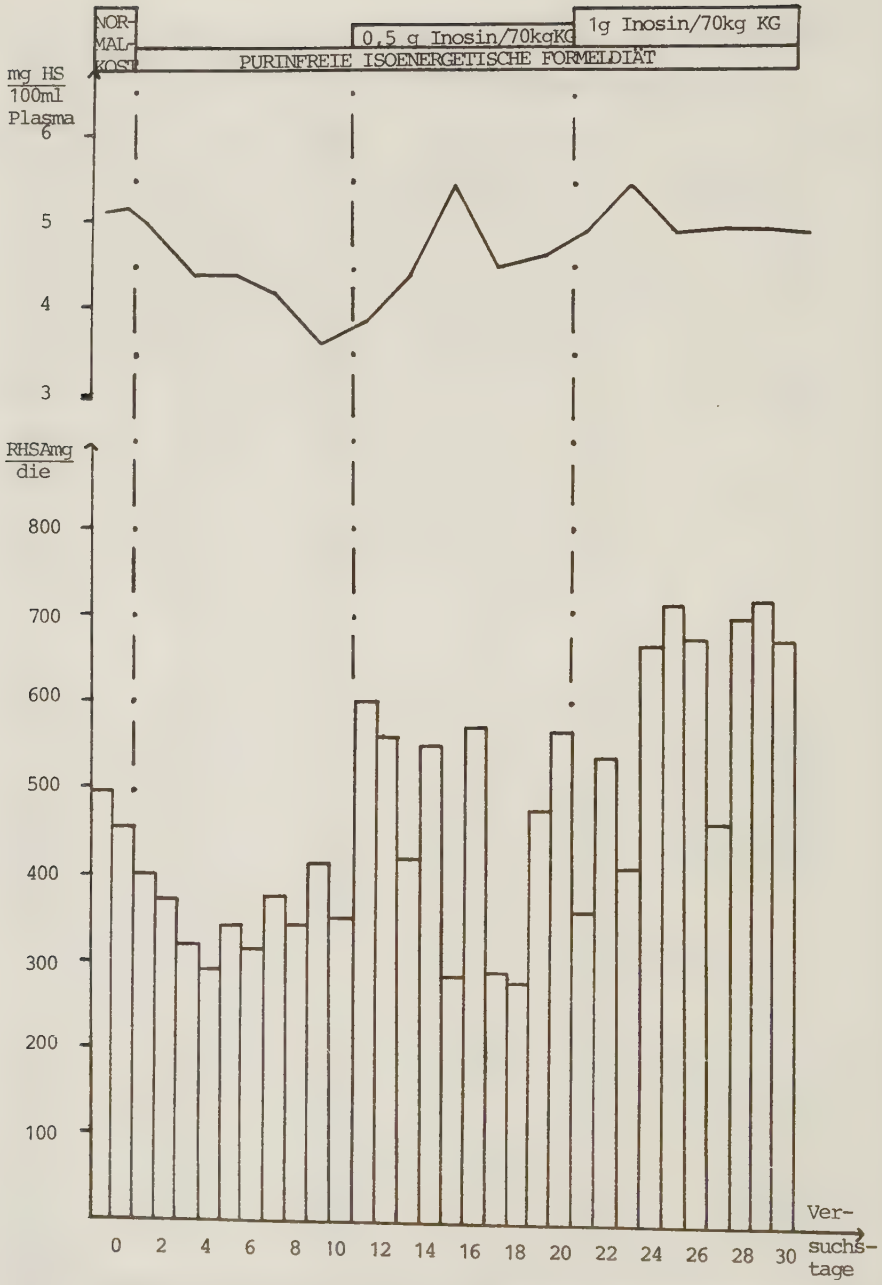

Abb. IV: Renale Harnsäureausscheidung und Plasmaharnsäurekonzentration von Versuchsperson M

4.1.3. Versuchsperson Z:

Die Meßergebnisse von Versuchsperson Z finden sich in Tabelle VI, ihre graphische Darstellung in Abbildung V.

Während der Vorperiode betrug die renale Harnsäureausscheidung 470mg/die, die Harnsäurekonzentration im Plasma 6,0mg/100ml (Vorperiode + Tag 1).

Unter purinfreier Diät nahm die Harnsäurekonzentration im Plasma rasch ab und erreichte eine Gleichgewichtskonzentration von 4,55mg/100ml (4,41 - 4,79mg/100ml) für die Tage 3 - 9; der stärker abweichende Wert von Tag 11 (5,1mg/100ml) wurde nicht in die Berechnung einbezogen. Die renale Harnsäureausscheidung erreichte am 4. Tag ein erstes Minimum von 218mg/die und zeigte bis zum Ende der Periode stärker schwankende Werte (195 - 349mg/die). Zur Berechnung der basalen Harnsäureausscheidung wurde Tag 4 wegen einer deutlich erniedrigten Kreatininausscheidung nicht herangezogen; für die Tage 5 - 10 ergibt sich ein Durchschnitt von 279mg Harnsäure/die.

Nach Zulage von 536mg Inosin/die (Tag 11 - 20) entsprechend einer präformierten Harnsäuremenge von 335mg erreichte die Harnsäurekonzentration im Plasma bis zum Ende dieser Periode keinen stabilen Gleichgewichtswert: am Tag 17 und 19 lag sie mit 4,46 bzw. 4,59mg/100ml im Bereich der Harnsäurekonzentration am Ende der purinfreien Phase (Tag 1 - 10, s.o.) und zeigte erst am 21. Tag einen deutlichen Anstieg auf 5,34mg/100ml. Die Harnsäureausscheidung im Urin zeigt von Tag 15 - 20 einen annähernd konstanten Wert, sieht man von Tag 18 mit einer deutlich erniedrigten Harnsäureausscheidung ab. Der Durchschnittswert für die Tage 15 - 17 mit 19 - 20 beträgt 375,6 (357 - 400) mg Harnsäure/die; er liegt somit um 96,6mg/die über dem Gleichgewichtswert der purinfreien Periode (Tag 1 - 10) entsprechend einer Inosin-

absorption von 28,8%. Dieser Wert ist mit Einschränkung zu betrachten, da er nach dem Verlauf des Harnsäurespiegels im Plasma (s.o.) noch keiner endgültigen Gleichgewichtseinstellung entsprechen dürfte.

Unter Gabe von 1071mg Inosin/die (Tag 21 - 30) entsprechend einer präformierten Harnsäuremenge von 670mg stieg die Harnsäurekonzentration im Plasma auf einen Gleichgewichtswert von 6,86mg/100ml (6,76 - 7,02) für die Tage 27 - 31 an. Die renale Harnsäureausscheidung zeigt ca. ab Tag 26 ein Plateau, der Durchschnittswert für die Tage 26 - 30 beträgt 572 (556 - 606) mg Harnsäure/die; die Differenz zur purinfreien Periode (Tag 1 - 10) beläuft sich auf 293mg/die, was einer Inosinabsorptionsquote von 43,7% entspricht.

Tabelle VI: Harnsäurekonzentration im Plasma, renale Harnsäure- und Kreatininausscheidung, sowie Urinvolumen von Versuchsperson Z

	Tag	HS Plasma mg/100ml	RHSA mg/die	gK/die	Urinvolumen ml/die
Vorperiode		6,33	438	1,11	1580
		5,86	502	1,14	1760
	1	5,80	400	0,97	1380
	2		311	1,28	1830
	3	4,52	302	0,96	1920
purinfreie	4		218	0,67	1980
Diät	5	4,48	240	1,39	1480
	6		340	1,08	2160
	7	4,79	349	1,08	1660
	8		295	1,25	1780
	9	4,41	195	0,83	1390
	10		256	1,21	1420
	11	5,10	495	1,21	2420
	12		306	0,76	1910
purinfreie	13	5,03	338	0,82	2050
Diät + 536mg	14		287	0,70	1740
Inosin/die	15	5,04	358	0,89	1770
(entspr.	16		357	0,84	1680
335mg HS)	17	4,46	400	0,99	1980
	18		216	0,77	1540
	19	4,59	381	0,82	1640
	20		382	0,84	1680
	21	5,34	431	0,91	2030
	22		480	0,70	2340
purinfreie	23	6,53	566	0,72	2070
Diät + 1071mg	24		528	0,84	1860
Inosin/die	25	6,19	540	0,81	1800
(entspr.	26		556	0,72	2060
670mg HS)	27	7,02	575	0,71	1770
	28		606	0,71	2020
	29	6,76	567	0,64	2140
	30		556	0,65	2180
	31	6,81			

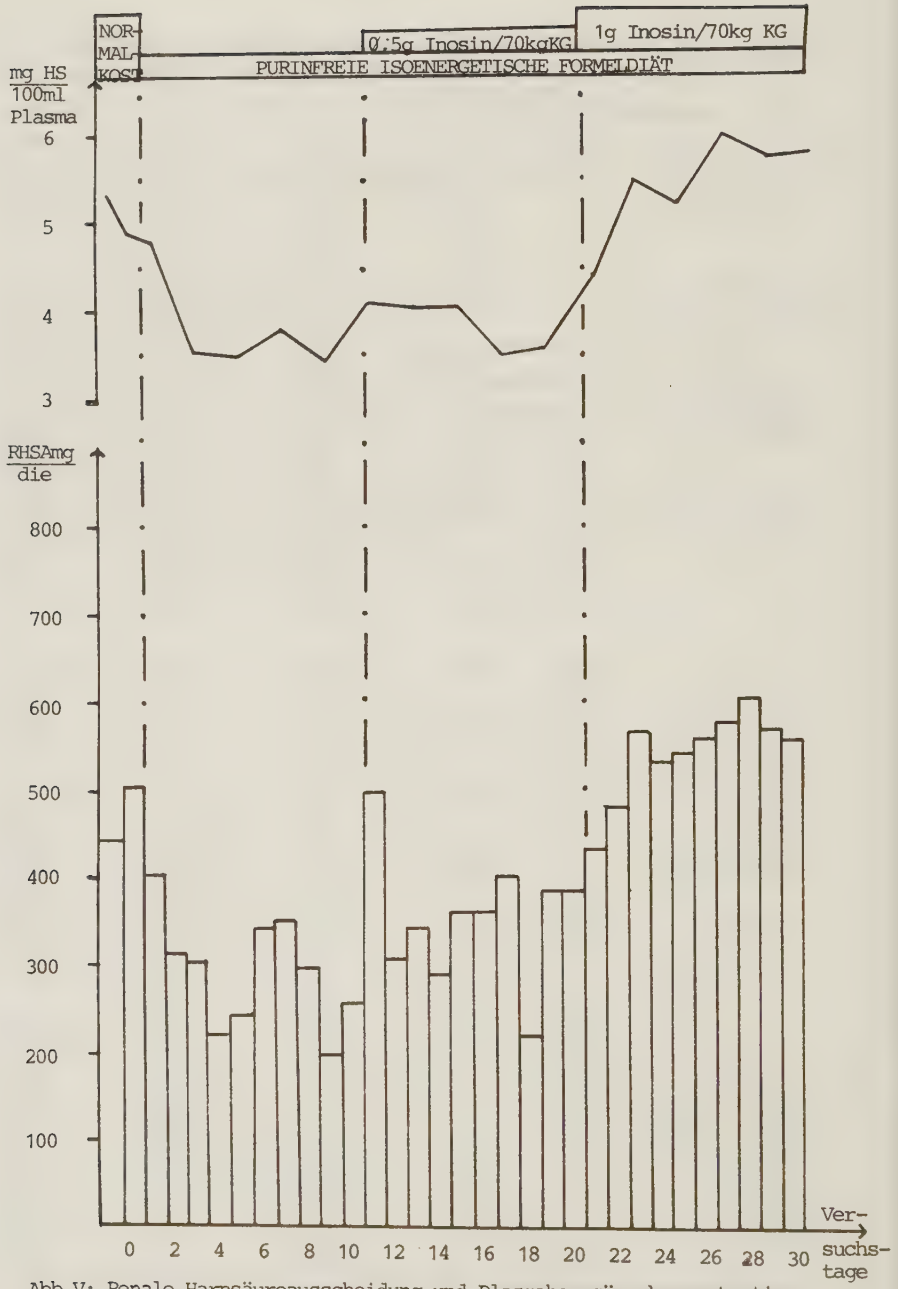

Abb.V: Renale Harnsäureausscheidung und Plasmaharnsäurekonzentration von Versuchsperson Z

4.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse des Ernährungsversuchs

Die Ergebnisse des Ernährungsversuchs sind in Tabelle VII und Abb. VI zusammengefaßt. Bei den Versuchspersonen M und Z ließ sich ein Gleichgewichtswert der Harnsäureausscheidung unter Inosin-Zulage nur für die 3. Versuchsperiode (1g Inosin/70kg Körpergewicht und Tag) ermitteln: die Inosinabsorptionsquote betrug hier bei Versuchsperson M 49,2% und bei Versuchsperson Z 43,7%.

Bei Versuchsperson E wurden während der täglichen Gabe von 0,5g Inosin/70kg KG 50,7% absorbiert und als Harnsäure im Urin ausgeschieden. Nach Verdoppelung der Inosinzulage im letzten Versuchs-
abschnitt wurde kein eindeutiger Gleichgewichtswert erhalten: je nach Auswahl der der Berechnung zugrunde gelegten Tage belief sich die Absorptionsquote auf 51,6 bzw. 60,4%. Da eine Zunahme der Inosinabsorptionsquote mit steigender Inosindosis eher unwahrscheinlich ist, dürfte die Absorptionsquote 51,6% betragen. Hiermit ergibt sich für alle Versuchspersonen eine durchschnittliche Inosinabsorptionsquote von 48,2% bei Gabe von 1g Inosin pro 70kg Körpergewicht. Nach dem Ergebnis von Versuchsperson E liegt die Absorptionsquote bei Gabe von 0,5g Inosin/70kg KG mit 50,7% in der gleichen Größenordnung. Die Inosinabsorptionsquote scheint daher im untersuchten Dosisbereich von 0,5 bis 1g Inosin pro 70kg Körpergewicht dosisunabhängig zu sein.

Die geringste Absorptionsquote von Inosin wies mit 43,7% Versuchsperson Z auf. Diese Versuchsperson hatte am Ende der purinfreien ersten Versuchsperiode eine deutlich höhere Harnsäurekonzentration im Plasma als die beiden anderen Versuchspersonen (4,55mg/100ml gegenüber 3,25 bzw. 3,76mg/100ml); unter der Zulage von 1g Inosin/70kg KG während der dritten Versuchsperiode

stieg die Harnsäurekonzentration im Plasma bei Versuchsperson Z stärker an als bei den beiden anderen Versuchspersonen (um 2,31mg/100ml gegenüber 2,05 bzw. 1,19mg/100ml; vgl. auch Abb. VI) und überschritt die obere Normgrenze für Harnsäure im Plasma von 6,5mg/100ml (s. Einleitung). Da bei Versuchsperson Z den hohen Harnsäurespiegeln eine relativ niedrige renale Harnsäureausscheidung gegenübersteht, besitzt sie eine deutlich niedrigere renale Harnsäureclearance als die beiden übrigen Versuchspersonen (s. Tabelle VII). Darüberhinaus zeigt die renale Harnsäureclearance von Versuchsperson Z eine wesentlich geringere Abhängigkeit von der Harnsäurekonzentration im Plasma als die der anderen Versuchspersonen: bei Vergleich von Versuchsperiode 1 mit Periode 3 findet sich ein Anstieg der Harnsäureclearance mit dem Harnsäurespiegel (s. Tabelle VII); dieser Anstieg beträgt, bezogen auf eine Erhöhung des Harnsäurespiegels um 1mg/100ml, bei Versuchsperson Z nur 0,66ml/Min. gegenüber 2,76 bzw. 1,27ml/Min. bei Versuchsperson M bzw. E.

Tabelle VII: Zusammenfassung der Ergebnisse des Ernährungsversuchs: Durchschnittswerte von renaler Harnsäureausscheidung und Harnsäurekonzentration im Plasma am Ende der einzelnen Versuchsperioden, sowie daraus berechnete Absorptionsquoten für Inosin und Harnsäureclearance.

Versuchsperson	E	M	Z
1. Versuchsperiode			
(purinfreie Diät)			
Harnsäureausscheidung (mg/die)	263	341,6	279
Harnsäurekonz. im Plasma (mg/100ml)	3,25	3,76	4,55
Harnsäureclearance (ml/Min)	5,62	6,31	4,26
2. Versuchsperiode			
(purinfreie Diät + 0,5g Inosin)			
Harnsäureausscheidung (mg/die)	441,5		
Harnsäurekonz. im Plasma (mg/100ml)	4,55		
Absorptionsquote Inosin (%)	50,7		
Harnsäureclearance (ml/Min)	6,74		
3. Versuchsperiode			
(purinfreie Diät + 1g Inosin)			
Harnsäureausscheidung (mg/die)	627	684	572
Harnsäurekonz. im Plasma (mg/100ml)	5,3	4,95	6,86
Absorptionsquote Inosin (%)	51,6	49,2	43,7
Harnsäureclearance (ml/Min)	8,22	9,6	5,79

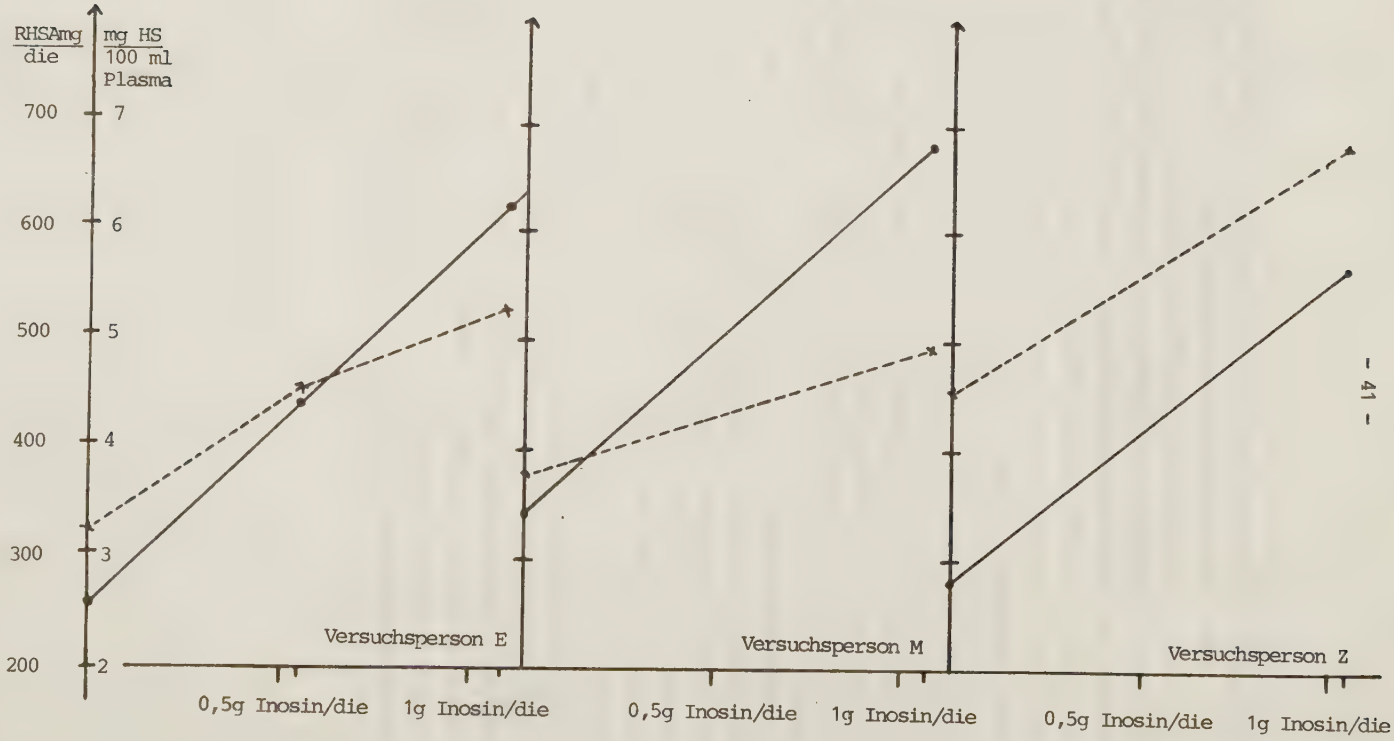

Abb.VI: Renale Harnsäureausscheidung (•——•) und Plasmaharnsäurekonzentration (x----x) bei den Versuchspersonen während des Ernährungsversuches in Abhängigkeit von der Inosinzulage zur purinfreien Formeldiät

4.2. ERGEBNISSE DER BESTIMMUNG DES PURINGEHALTS VON FLEISCH

Provenienz, exaktes Gewicht der verarbeiteten Probe und Umrechnungsfaktor für 1g Fleisch sind in der folgenden Tabelle VIII angegeben:

Fleischprobe	Provenienz	Gewicht (mg)	Umrechnungsfaktor für 1g Fleisch
1	Schwein	297	3,367
2	"	300	3,333
3	Huhn	296	3,378
4	"	304	3,289
5	Rind	294	3,401
6	"	305	3,279
7	Kalb	292	3,425
8	"	303	3,3

4.2.1. Ergebnis der Bestimmung des Hypoxanthin- und Inosingehalts von Fleisch

Das HPLC-Chromatogramm der Standardmischung für das Umkehrphasensystem (s.o. S. 21) ist in Abb. VII wiedergegeben. Alle 6 Komponenten der Mischung sind vollständig voneinander getrennt.

Die photometrische Konzentrationsbestimmung ergab für die Stammlösungen von

- Hypoxanthin: Extinktionswerte der Verdünnung 1:20 : 0,130/ 0,130/ 0,131, somit beträgt der Mittelwert 0,1303; dividiert man diesen Wert durch den Extinktionskoeffizienten 10700, so erhält man für die Verdünnung 1:20 eine Konzentration von

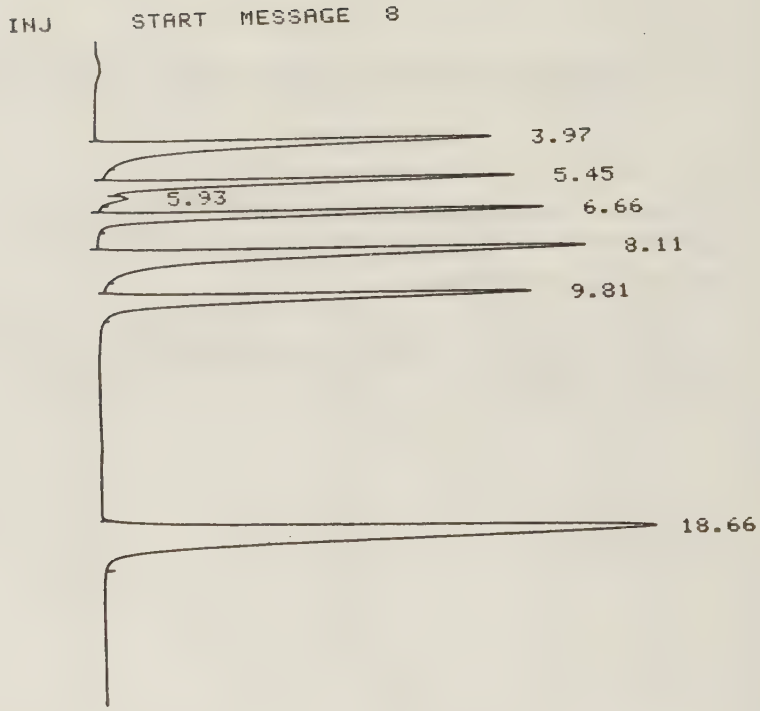

Abb. VII: HPLC-Chromatogramm der Standardmischung für das Umkehrphasensystem (s.o.S.21f.). Injektionsvolumen 0,02 ml, Attenuation 2^5, Slope Sensitivity 0,15.

Substanz	Retentionszeit (Min)	Peakfläche (Area)	Konzentration (mM)
ADP	3,97	35120	
IMP	5,45	26940	
Harnsäure	6,66	28250	
Hypoxanthin	8,11	51360	0,058
Xanthin	9,81	40200	
Inosin	18,66	96480	0,1048

0,0122mM, für die Stammlösung eine Konzentration von 0,2436mM und für die Standardmischung eine Hypoxanthinkonzentration von 0,058mM (Verdünnuung 1:4,2), entsprechend einer Peak-Area von 51360 bei Injektion von 0,02ml Standardmischung. Hiermit ergibt sich für die Hypoxanthin-Peaks der Fleisch-Extrakte ein Umrechnungsfaktor von 0,058mM/51360 Area = 0,00113 µM/Area.

- Inosin: Extinktionswerte der Verdünnung 1:20 : 0,674/0,680/0,676; somit beträgt der Mittelwert 0,6766; dividiert man diesen Wert durch den Extinktionskoeffizienten 12300, so erhält man für die Verdünnung 1:20 eine Konzentration von 0,055mM, für die Stammlösung eine Konzentration von 1,1mM und für die Standardmischung eine Inosinkonzentration von 0,1048mM (Verdünnung 1:10,5), entsprechend einer Peak-Area von 96480 bei Injektion von 0,02ml Standardmischung. Hiermit ergibt sich für die Inosin-Peaks der Fleisch-Extrakte ein Umrechnungsfaktor von 0,1048mM/96480 Area = 0,001086 µM/Area.

Das Umkehrphasen-HPLC-Chromatogramm von 0,02ml eines TCA-Fleisch-Extrakts (Probe 3) ist in der folgenden Abb. VIII wiedergegeben:

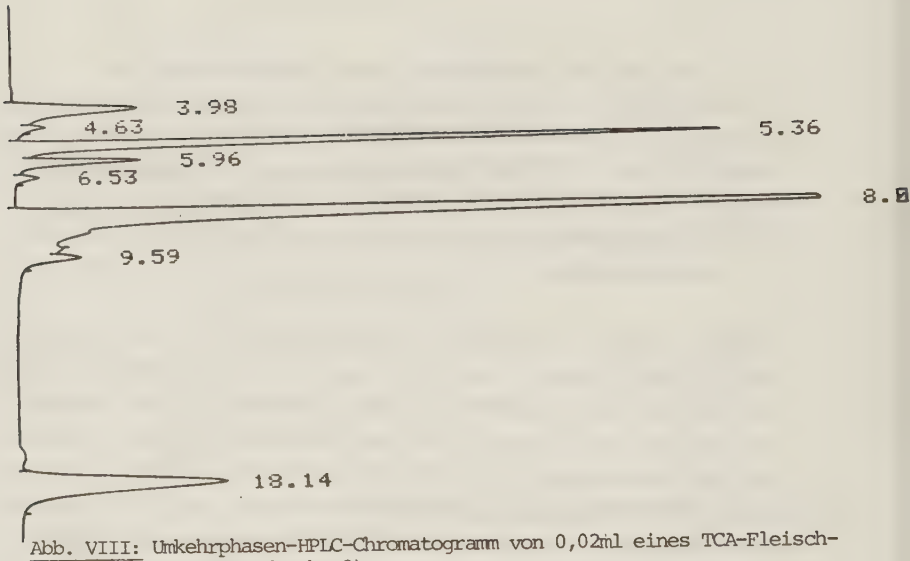

Abb. VIII: Umkehrphasen-HPLC-Chromatogramm von 0,02ml eines TCA-Fleisch-Extraktes (Probe 3)

Gegenüber dem HPLC-Chromatogramm der Standardmischung (vgl. Abb. VII) sind die Retentionszeiten insbesondere der später eluierenden Substanzen gering verkürzt; dennoch lassen sich die folgenden Peaks mit Sicherheit identifizieren:

Substanz	Retentionszeit (Min)	Peakfläche (Area)	Konzentration (mM)
ADP	3,98	14310	
IMP	5,36	45360	
Harnsäure	6,53	1386	
Hypoxanthin	8,02	98960	0,112
Xanthin	9,59	1786	
Inosin	18,14	34880	0,038

Die Konzentration von ADP und IMP wurde mit dem Anionenaustauschersystem bestimmt (s.u.), Harnsäure- und Xanthin-Peak wurden

Tabelle IX: Hypoxanthin- und Inosingehalt von Fleisch, bestimmt im TCA-Extrakt (10ml Gesamtvolumen) mit Umkehrphasen-HPLC.

	Schwein		Huhn		Rind		Kalb	
Fleischprobe	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Hypoxanthin								
Area	26760	29970	98960	107300	86140	108700	92940	106200
Konzentration (µM) im TCA-Extrakt	30,22	33,84	111,75	121,17	97,28	122,75	104,96	119,93
Menge (µmol) in extrahierter Probe	0,302	0,338	1,1175	1,2117	0,973	1,2275	1,0496	1,1993
Menge (µmol) in 1g Fleisch	1,018	1,128	3,775	3,985	3,308	4,025	3,595	3,958
2. Inosin								
Area	68480	79920	34880	42530	56290	65440	43290	47370
Konzentration (µM) im TCA-Extrakt	74,39	86,81	37,89	46,2	61,14	71,08	47,02	51,45
Menge (µmol) in extrahierter Probe	0,744	0,868	0,379	0,462	0,611	0,711	0,47	0,5145
Menge (µmol) in 1g Fleisch	2,505	2,894	1,28	1,52	2,079	2,331	1,61	1,698

wegen Geringfügigkeit nicht berücksichtigt; Harnsäure war nur in den Extrakten 3 und 4, Xanthin in 3 - 8 nachweisbar. In der folgenden Tabelle IX sind Hypoxanthin- und Inosinkonzentration in den TCA-Extrakten (10ml) der Fleischproben, sowie die in den analysierten Fleischmengen bzw. in 1g Fleisch enthaltenen Hypoxanthin- und Inosinmengen angegeben:

Bei Betrachtung von Tabelle IX fällt der große Unterschied im Hypoxanthingehalt von Schweinefleisch gegenüber den anderen Fleischproben auf: Hühner-, Rind- und Kalbfleisch enthalten durchschnittlich 3,774 (3,308 - 4,025) µmol Hypoxanthin pro g, somit 3,5mal so viel wie Schweinefleisch. Der Inosingehalt beträgt bei Schweinefleisch das 2,5-fache des Hypoxanthingehalts, bei den übrigen Fleischproben findet sich das umgekehrte Verhältnis: bei Hühnerfleisch überwiegt der Hypoxanthingehalt den Inosingehalt um das 2,8-fache, bei Rindfleisch um das 1,7-fache und bei Kalbfleisch um das 2,3-fache.

4.2.2. Ergebnis der Bestimmung des Purinnukleotidgehalts von Fleisch

Das HPLC-Chromatogramm der Standardmischung für das Anionenaustauschersystem (s.o. S.22f.) ist in Abb. IX wiedergegeben. Alle 8 Komponenten der Mischung sind vollständig voneinander getrennt. Da dieses HPLC-System keine sichere Trennung von IMP, XMP und GMP erlaubt, wurden die Chromatogramme sowohl bei 254 als auch bei 280nm registriert und das Peakflächenverhältnis von 280 zu 254nm zur Peakidentifizierung herangezogen (vgl. Abb. IX und X).
Das Ergebnis der photometrischen Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen und damit auch der Standardmischung ist in Tab. X aufgeführt.

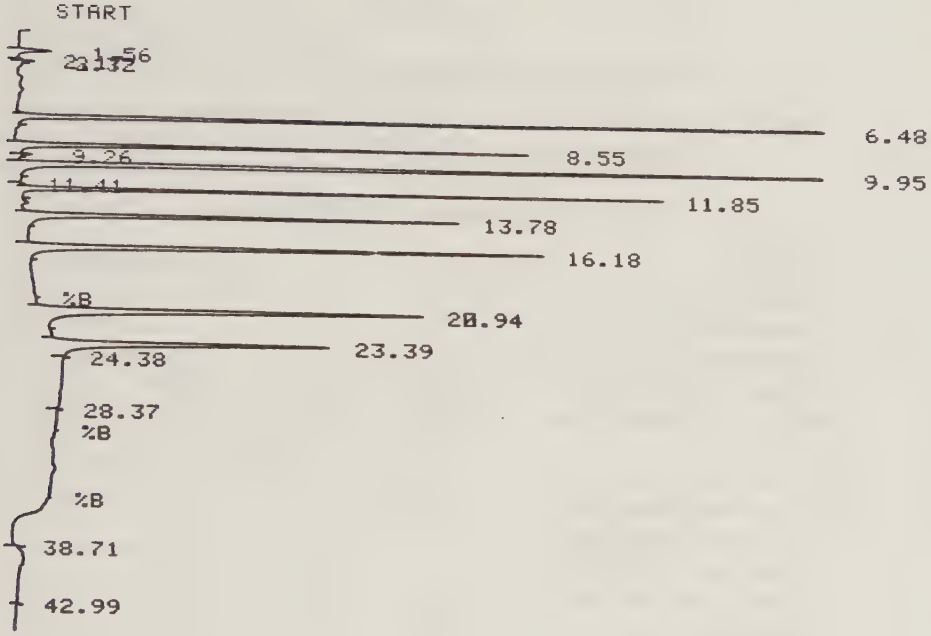

Abb. IX: HPLC-Chromatogramm der Standardmischung für das Anionenaustauschersystem (s.o. S.20-23). Injektions-Volumen 0,05ml. 254nm. Attenuation 2^5. Slope sensitivity 0,1. Papiervorschub 0,25cm/min.

Substanz	Retentionszeit (min)	Peakfläche (Area) 254nm	280nm	Ratio 280:254nm	Konzentration (mM)
AMP	6,48	44730	11260	0,25	0,015
NAD	8,55	22470	6716	0,3	
IMP	0,95	77960	15500	0,2	0,04
UDP-Glucose	11,85	23680	11080	0,47	
ADP	13,78	24680	5689	0,23	0,009
GDP	16,18	32570	20870	0,64	
ATP	20,94	32380	7668	0,24	0,011
GTP	23,39	25020	14690	0,59	
gesondert bestimmt:					
XMP	9,93	35100	11010	0,31	
GMP	10,02	68420	39190	0,57	

Tabelle X: Photometrische Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen von AMP, IMP, ADP und ATP (die verwendeten pH-Werte, Wellenlängen und Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle III, S. 23 angegeben).

Substanz	AMP	IMP	ADP	ATP
Konzentration der Stammlösung (mg/100ml eingewogen)	10	17	7	10,5
maximale Extinktion der 1 : 11-Verdünnung	0,410 0,412 0,410	(0,472) 0,446 0,446	0,255 0,255 0,252	0,298 0,3 0,301
Konzentration der Stammlösung (mM, aus Extinktion berechnet)	0,301	0,402	0,186	0,224
Verdünnung im Standardmix (Volumen 5ml)	1:20	1:10	1:20	1:20
Konzentration im Standardmix (mM)	0,015	0,04	0,009	0,011
Umrechnungsfaktor für Peakareas (254nm) (nM/Area)	0,3366	0,517	0,3773	0,3462

Das Anionenaustauscher-HPLC-Chromatogramm von 0,05ml eines TCA-Fleisch-Extrakts (Probe 6) ist in Abb. X wiedergegeben:

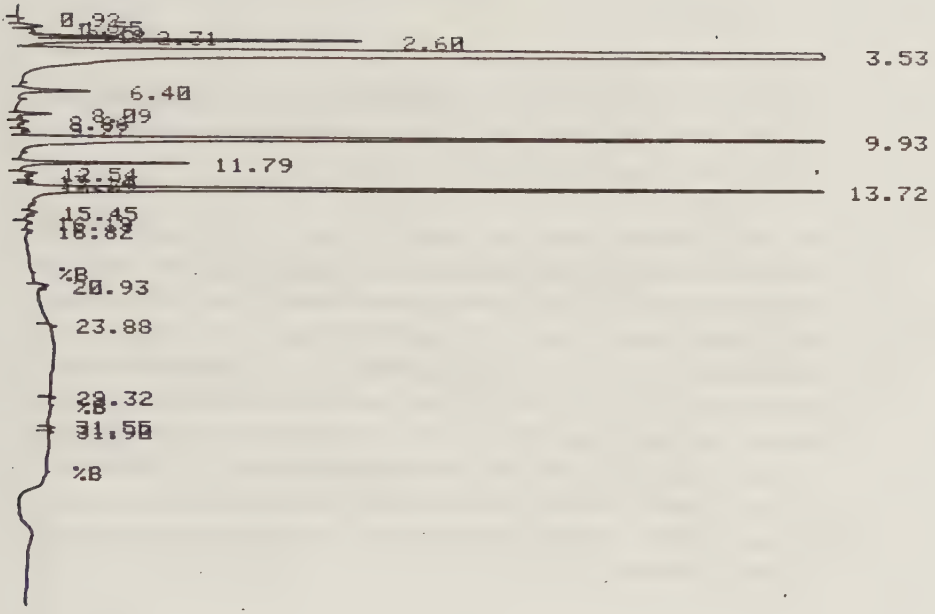

Abb. X: HPLC-Chromatogramm des Fleisch-Extrakts 6 im Anionenaustauschersystem. Bedingungen wie in Abb. IX. Identifizierbare Verbindungen:

Substanz	Retentionszeit (Min)	Peakfläche (Area) 254nm	280nm	Ratio 280:254nm	Konzentration (µM)
AMP	6,40	3408			1,15
IMP	9,93	93380	15880	0,17	48,28
?	11,79	7230	1309	0,18	
ADP	13,72	61130	13520	0,22	23,06
ATP	20,93	575			0,2

Der Peak mit der Retentionszeit 3,53 enthält ungetrennt Hypoxanthin und Inosin. Der Peak mit der Retentionszeit 11,79 könn-

te von der Retentionszeit her UDP-Glucose sein; nach dem Verhältnis der Peakflächen bei 280 zu 254nm von 0,18 muß es sich jedoch um ein nicht identifizierbares Purin handeln.

In der folgenden Tabelle XI sind die AMP-, IMP-, ADP- und ATP-Konzentrationen in den TCA-Extrakten (10ml) der Fleischproben, sowie die in den analysierten Fleischmengen bzw. in 1g Fleisch enthaltenen AMP-, IMP-, ADP- und ATP-Mengen aufgeführt. ATP konnte nur noch in den Fleischproben 6 - 8 in kleiner Menge nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung von Tabelle XI fällt erneut ein deutlicher Unterschied zwischen Schweinefleisch (Probe 1 und 2) und den übrigen Fleischproben auf: Schweinefleisch enthält wesentlich mehr IMP, und zwar 1,6mal so viel wie Hühnerfleisch, 3mal so viel wie Rindfleisch und 1,8mal so viel wie Kalbfleisch.

Tabelle XI: Nukleotidgehalt von Fleisch, bestimmt im TCA-Extrakt (10ml) mit Anionenaustauscher-HPLC.

	Schwein		Huhn		Rind		Kalb	
Fleischprobe	1	2	3	4	5	6	7	8
1. AMP								
Area	1328	2663	1356	1372	2684	3408	2455	3094
Konzentration (nM) im TCA-Extrakt	447,1	896,5	456,5	461,9	903,6	1147,4	826,5	1041,6
Menge (nmol) in extrahierter Probe	4,471	8,965	4,565	4,619	9,036	11,474	8,265	10,416
Menge (nmol) in 1g Fleisch	15,05	29,88	15,42	15,19	30,73	37,62	28,31	34,37
2. IMP								
Area	232900	265800	132100	173000	71840	93380	140900	132500
Konzentration (µM) im TCA-Extrakt	120,41	137,42	68,3	89,44	37,14	48,28	72,85	68,5
Menge (µmol) in extrahierter Probe	1,2041	1,3742	0,683	0,8944	0,3714	0,4828	0,7285	0,685
Menge (µmol) in 1g Fleisch	4,054	4,581	2,307	2,942	1,263	1,583	2,495	2,261

Fortsetzung Tabelle XI:

	Schwein		Huhn		Rind		Kalb	
Fleischprobe	1	2	3	4	5	6	7	8
3. ADP								
Area	41150	49920	32760	38180	51520	61130	47150	51710
Konzentration (µM) im TCA-Extrakt	15,53	18,83	12,36	14,41	19,44	23,06	17,79	19,51
Menge (µmol) in extrahierter Probe	0,1553	0,1883	0,1236	0,1441	0,1944	0,2306	0,1779	0,1951
Menge (µmol) in 1g Fleisch	0,523	0,628	0,418	0,474	0,661	0,756	0,609	0,644
4. ATP								
Area						575	896	664
Konzentration (nM) im TCA-Extrakt						199,1	310,2	229,9
Menge (nmol) in extrahierter Probe						1,991	3,102	2,299
Menge (nmol) in 1g Fleisch						6,53	10,62	7,59

In den Fleischextrakten 1 - 5 konnte kein ATP nachgewiesen werden.

4.2.3. Ergebnis der Bestimmung des RNS-Purin-Ribose-Gehalts von Fleisch

Zunächst wurde die Konzentration der Inosin-Stammlösung photometrisch bestimmt: je 1ml der Inosinlösung wurde mit 1ml 1n Perchlorsäure 1:2 verdünnt und bei 251nm gegen 1n Perchlorsäure photometriert. Die Extinktion betrug 0,520 / 0,522 und 0,529. Der Mittelwert 0,5237 wurde durch den Extinktionskoeffizienten 10900 dividiert, wonach für die 1:2-Verdünnung eine Konzentration von 0,048mM und für die Stammlösung eine Konzentration von 0,0961mM erhalten wurde.

Zur Erstellung der Eichkurve wurden 1, 2, 4, 6 und 8ml der Inosinstammlösung mit 1n Perchlorsäure auf 10ml aufgefüllt und mit diesen Verdünnungen die Orcinolreaktion durchgeführt (s.S. 24). Das Ergebnis ist in Tabelle XII und in Abb. XI zusammengestellt:

Tabelle XII: Eichkurve zur Bestimmung des RNS-Purin-Ribose-Gehalts.

ml Inosin-Stammlösung pro 10ml	Verdünnung	Konzentration (µM)	Extinktion bei 660 nm	Extinktion bei 660nm für 1µM-Lösung
1	1:10	9,61	0,066 0,060	0,0065556
2	1: 5	19,22	0,115 0,115	0,0059833
4	1: 2,5	38,44	0,240 0,249	0,0063605
6	1: 1,67	57,66	0,366 0,371	0,0063909
8	1: 1,25	76,88	0,490 0,502	0,0064516

Die durchschnittliche Extinktion für eine 1 µM-Lösung beträgt über den ganzen Konzentrationsbereich 0,0063484, die Eichkurve ist über den verwendeten Konzentrationsbereich linear (Abb. XI).

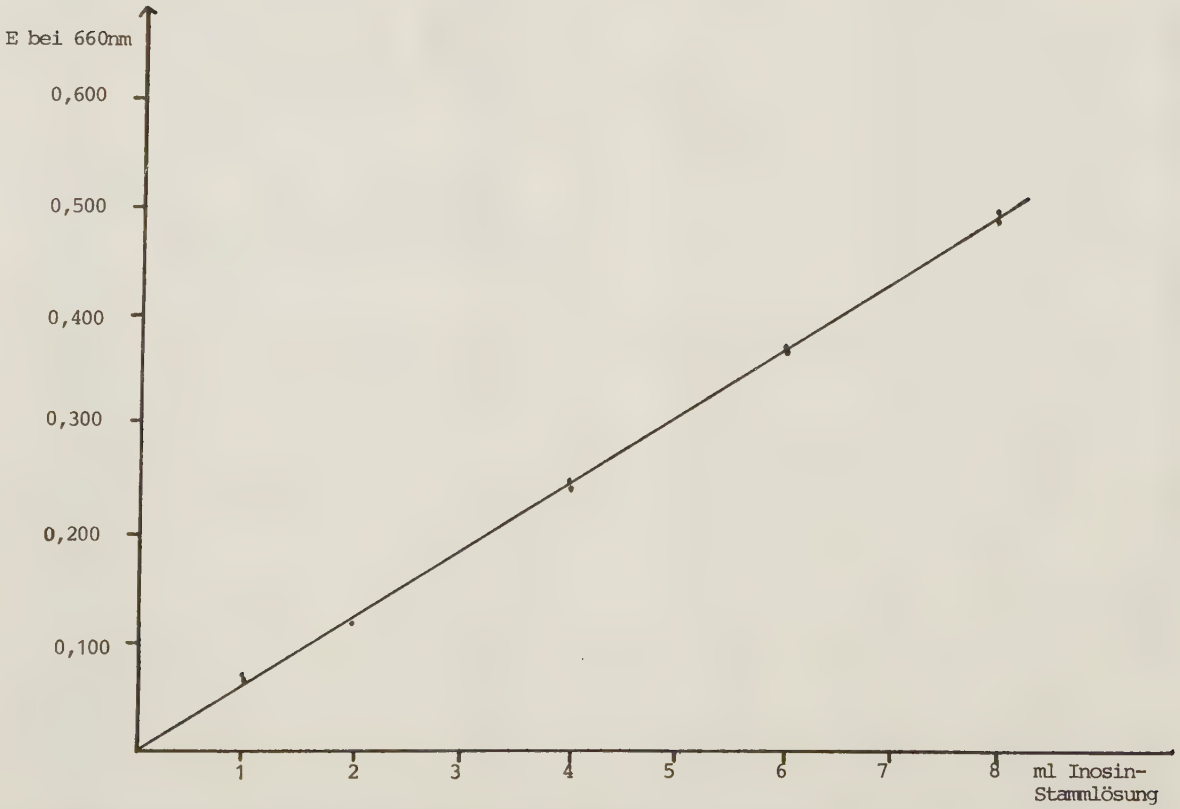

Abb. XI: Eichkurve zur Bestimmung der RNS-Purin-Ribosekonzentration

Mit den Perchlorsäureextrakten (15 Stunden 4°C, s.o. S. 19) der TCA-Pellets wurde nun ebenfalls die Orcinolreaktion durchgeführt. Die durchschnittliche Extinktion der einzelnen Proben bei 660nm ist in Tabelle XIII wiedergegeben, ebenso wie die - mit dem der Eichkurve entnommenen Koeffizienten (0,0063484) berechneten - Konzentrationen bzw. Mengen von RNS-Purin-Ribose im Extrakt bzw. in 1g Fleisch. Abgesehen von Probe 44 mit einer Extinktion von 0,529 liegen die Extinktionen aller Proben im Bereich der Eichkurve. Den höchsten RNS-Purin-Ribose-Gehalt weist Hühnerfleisch auf (2,368 bzw. 2,738µmol/g), den niedrigsten Rindfleisch (1,302 bzw. 1,358µmol/g).

Tabelle XIII: RNS-Purin-Ribose- und DNS-Purin-d-Ribose-Gehalt von Fleisch.

	Schwein		Huhn		Rind		Kalb	
Fleischprobe	1	2	3	4	5	6	7	8
1. RNS-Purin-Ribose								
Extinktion 660nm	0,324	0,367	0,445	0,529	0,243	0,263	0,323	0,333
Konzentration (µM) im Perchlorsäure-extrakt (4°C)	50,96	57,73	70,1	83,25	38,28	41,43	50,8	52,38
Menge (µmol) im extrahierten Fleisch	0,51	0,577	0,701	0,833	0,383	0,414	0,508	0,524
Menge (µmol) in 1g Fleisch	1,716	1,924	2,368	2,738	1,302	1,358	1,74	1,729
2. DNS-Purin-d-Ribose								
Extinktion 595nm	0,064	0,068	0,05	0,06	0,035	0,041	0,059	0,064
Konzentration (µM) im Perchlorsäure-extrakt (80°C)	6,79	7,22	5,308	6,37	3,716	4,35	6,26	6,79
Menge (µmol) im extrahierten Fleisch	0,068	0,072	0,053	0,064	0,037	0,0435	0,063	0,068
Menge (µmol) in 1g Fleisch	0,229	0,24	0,179	0,21	0,126	0,143	0,21	0,224

4.2.4. Ergebnis der Bestimmung des DNS-Purin-Desoxyribose-Gehalts

Zunächst wurde die Konzentration der d-Inosin-Stammlösung photometrisch bestimmt: je 1ml der d-Inosinlösung wurde mit 2ml 1n Perchlorsäure 1:3 verdünnt und bei 251nm gegen 1n Perchlorsäure photometriert. Die erhaltenen Extinktionswerte betrugen 0,511 / 0,509 und 0,510. Der Mittelwert 0,51 wurde durch den Extinktionskoeffizienten 10900 dividiert, wonach sich für die 1:3-Verdünnung eine Konzentration von 0,047mM und für die Stammlösung eine Konzentration von 0,14mM ergab.

Zur Erstellung der Eichkurve wurden 1, 2, 4, 6 und 8ml der d-Inosin-Stammlösung mit 1n Perchlorsäure auf 10ml aufgefüllt und mit diesen Verdünnungen die Diphenylaminreaktion durchgeführt (s.o.S. 25). Das Ergebnis ist in Tabelle XIV und in Abb. XII zusammengestellt:

Tabelle XIV: Eichkurve zur Bestimmung des DNS-Purin-Desoxyribose-Gehalts.

ml d-Inosin-Stammlösung pro 10ml	Verdünnung	Konzentration (µM)	Extinktion bei 595nm	Extinktion bei 595nm für 1µM-Lösung
1	1:10	14	0,127 0,128	0,009107
2	1: 5	28	0,270 0,275	0,009732
4	1: 2,5	56	0,537 0,488	0,009589 0,008714
6	1: 1,67	84	0,658 0,660	0,007845
8	1: 1,25	112	0,837 0,840	0,007487

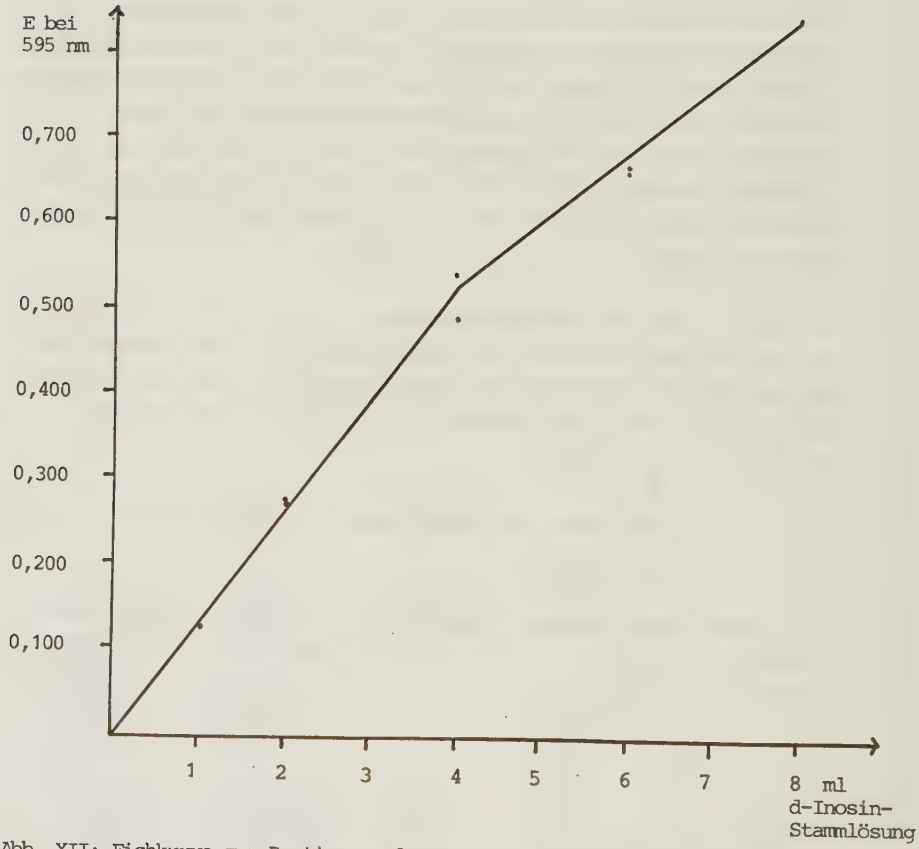

Abb. XII: Eichkurve zur Bestimmung des DNS-Purin-Desoxyribose-Gehaltes

Die Eichkurve ist nur im unteren Konzentrationsbereich linear; bei der Verdünnung 1:2,5 wurde eine größere Diskrepanz zwischen den Doppelwerten erhalten. Da die mit heißer Perchlorsäure (30 Minuten 80°C, s.o.S. 19) hergestellten Extrakte bei der Diphenylaminreaktion Extinktionen nur im untersten Konzentrationsbereich der Eichkurve lieferten (s. Tabelle XIII/2.), wurde die durchschnittliche Extinktion einer 1µM-Lösung nur für den Bereich der größten Verdünnungen, d.h. für Verdünnung 1:10 und 1:5 berechnet: sie beträgt 0,0094195. Mit diesem Koeffizienten wurde die DNS-Purin-Desoxyribosekonzentration in den Fleischextrakten berechnet: sie ist ebenso wie die im extrahierten Fleisch bzw. in 1g Fleisch enthaltene DNS-Purin-Desoxyribosemenge in Tabelle XIII aufgeführt.

Der niedrigste DNS-Purin-Gehalt fand sich demnach in Rindfleisch (Probe 5 und 6) mit 0,126 bzw. 0,143µmol/g; die übrigen Fleischproben wiesen einen etwas höheren DNS-Purin-Gehalt von durchschnittlich 0,215µmol/g (0,18 - 0,24) auf. Das Verhältnis von DNS zu RNS beträgt in Schweine- und Kalbfleisch 1:8, in Rindfleisch 1:10 und in Hühnerfleisch 1:13.

4.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung des Puringehalts von Fleisch

Die gemessenen Konzentrationen der einzelnen Purinverbindungen sind in Tabelle XV zusammengestellt. Tabelle XVI zeigt den prozentualen Anteil der einzelnen Purinverbindungen am Gesamtpuringehalt von Fleisch. Der Hauptanteil besteht mit durchschnittlich 80,5% (75,2 - 85,4%) aus monomeren Purinverbindungen; ihm steht ein durchschnittlicher RNS-Purin-Anteil von 17,7% (13,3 - 23,1%) und ein durchschnittlicher DNS-Purin-Anteil von 1,8% (1,4 - 2,2%) gegenüber. Die Zusammensetzung der monomeren Purinverbindungen ist in den einzelnen Fleischproben recht unterschiedlich: in Schweinefleisch stellt IMP die Hauptkomponente dar (40,2% des Gesamtpuringehalts), gefolgt von Inosin (25,1% des Gesamtpuringehalts) und Hypoxanthin (10%); bei den übrigen Fleischproben war dagegen Hypoxanthin die quantitativ bedeutsamste Purinverbindung mit einem durchschnittlichen Anteil von 36,6% (33,5 - 39,3%) am Gesamtpuringehalt. Der Inosinanteil betrug in Rindfleisch ähnlich wie in Schweinefleisch 23,3%, in Hühner- und Kalbfleisch dagegen nur 12,6% bzw. 15,9%. Dafür belief sich der IMP-Anteil in Hühner- und Kalbfleisch auf durchschnittlich 23,2% (21,5 - 24,8%) gegenüber 14,5% in Rindfleisch. Der höchste ADP-Anteil fand sich mit 7,5% in Rindfleisch, der höchste ATP-Anteil mit 0,1% in Kalbfleisch. Der Gesamtpuringehalt der untersuchten Fleischproben beträgt durchschnittlich 10,4µmol/g bzw. 1,04mmol/100g entsprechend einem virtuellen Harnsäuregehalt von 1,75mg/g bzw. 175mg/100g oder einem Purin-N-Gehalt von 58,24mg/100g.

Tabelle XV: Gesamtpuringehalt von Fleisch in µmol/g

	Schwein		Huhn		Rind		Kalb	
Fleischprobe	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Hypoxanthin	1,018	1,128	3,775	3,985	3,308	4,025	3,595	3,958
2. Inosin	2,505	2,894	1,28	1,52	2,079	2,331	1,61	1,698
3. AMP	0,015	0,03	0,015	0,015	0,031	0,038	0,028	0,034
4. IMP	4,054	4,581	2,307	2,942	1,263	1,583	2,495	2,261
5. ADP	0,523	0,628	0,418	0,474	0,661	0,756	0,609	0,644
6. ATP	-	-	-	-	-	0,007	0,011	0,008
Summe der monomeren Purinverbindungen	8,115	9,261	7,795	8,936	7,342	8,74	8,348	8,603
7. RNS-Purine	1,716	1,924	2,368	2,738	1,302	1,358	1,74	1,729
8. DNS-Purine	0,229	0,24	0,179	0,21	0,126	0,143	0,21	0,224
Summe der polymeren Purinverbindungen	1,945	2,164	2,547	2,948	1,428	1,5	1,95	1,953
Gesamtpuringehalt - in µmol/g	10,06	11,425	10,34	11,88	8,77	10,24	10,3	10,556
- als Harnsäure (mg/g)	1,69	1,92	1,74	2,01	1,47	1,72	1,73	1,773

Tabelle XVI: Prozentualer Anteil der einzelnen Purinverbindungen am Gesamtpuringehalt von Fleisch

	Schwein		Huhn		Rind		Kalb	
Fleischprobe	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Hypoxanthin	10,1	9,9	36,5	33,5	37,7	39,3	34,9	37,5
2. Inosin	24,9	25,3	12,4	12,8	23,7	22,8	15,6	16,1
3. AMP	0,15	0,3	0,15	0,1	0,35	0,35	0,25	0,3
4. IMP	40,3	40,1	22,3	24,8	14,4	15,45	24,2	21,4
5. ADP	5,2	5,5	4	4	7,5	7,4	5,9	6,1
6. ATP	-	-	-	-	-	0,05	0,1	0,1
Summe der monomeren Purinverbindungen	80,7	81,1	75,4	75,2	83,7	85,35	81,0	81,5
7. RNS-Purine	17,1	16,8	22,9	23,1	14,9	13,25	16,9	16,4
8. DNS-Purine	2,2	2,1	1,7	1,7	1,4	1,4	2,0	2,1
Summe der polymeren Purinverbindungen	19,3	18,9	24,6	24,8	16,3	14,65	18,9	18,5

5. DISKUSSION

5.1. DISKUSSION DER ERGEBNISSE DES ERNÄHRUNGSVERSUCHS

Die in Abbildung III - V dargestellten Versuchsergebnisse zeigen bei den einzelnen Versuchspersonen zum Teil ausgeprägte Schwankungen der renalen Harnsäureausscheidung und der Harnsäurespiegel im Plasma. Für die 2. Versuchsperiode der Versuchspersonen M und Z konnte aufgrund dieser Schwankungen kein Gleichgewichtswert der Harnsäureausscheidung berechnet werden. Als Ursache dieser Schwankungen sind Probleme anzusehen, die die ambulante Durchführung von Ernährungsversuchen mit sich bringt:

- Diätfehler lassen sich bei ambulanten Versuchspersonen kaum ausschließen.

- die vollständige Urinsammlung ist bei ambulanten Versuchspersonen schwierig, da stets Sammelflaschen mitgeführt werden müssen, was situationsbedingt unpassend bzw. unangenehm sein kann. Zum Nachweis von Sammelfehlern wurde daher neben der Harnsäureausscheidung auch die Kreatininausscheidung bestimmt. Aufgrund größerer Abweichungen der Kreatininausscheidung mußten einzelne Versuchstage eliminiert werden.

- wie Versuche von HARKNESS et al. (11) gezeigt haben, werden an Tagen mit längerdauernder körperlicher Belastung bedeutende Mengen der Harnsäurevorstufe Hypoxanthin im Urin ausgeschieden. Dieses Hypoxanthin entstammt dem ATP-Abbau in der Muskulatur. Mit der Blutzirkulation gelangt ein Teil des freigesetzten Hypoxanthins in die Nieren, wo es mit hoher Clearance-

Rate ausgeschieden wird (6); ein anderer Teil wird in Leber lnd Darmschleimhaut zu Harnsäure umgewandelt. Das abgebaute ATP wird zumindest teilweise durch Synthese de-novo ersetzt. Somit ist für Versuchstage, an denen die ambulanten Versuchspersonen größere körperliche Belastungen durchgeführt haben, eine gesteigerte Harnsäureproduktion und de-novo-Synthese von Purinen zu erwarten.

- es kann mehr als 24 Stunden dauern, bis alle nach oraler Purinzufuhr gebildete Harnsäure ausgeschieden ist (4). Hieraus folgt, daß eine zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgende Einnahme der Nahrungspurine, insbesondere der Abenddosis, zu einer unterschiedlichen Verteilung der gebildeten und ausgeschiedenen Harnsäuremenge auf den Einnahmetag bzw. den darauffolgenden Tag führen kann.

- die unter ambulanten Bedingungen stark schwankende Flüssigkeitszufuhr sollte dagegen keinen Einfluß auf die Harnsäureausscheidung besitzen (13).
  Die genannten Störfaktoren können eliminiert werden, wenn Ernährungsversuche auf Stoffwechselstationen mit stationären Versuchspersonen durchgeführt werden.

Nach dem Ergebnis des vorliegenden Ernährungsversuchs liegt die Absorptionsquote von oral verabreichtem Inosin bei 50%, und zwar offensichtlich unabhängig davon, ob 0,5g oder 1g/70kg Körpergewicht verabreicht wurde. Diese konstante, dosisunabhängige Absorptionsquote stellt ein interessantes Phänomen dar. Sie wurde von WASLIEN et al. (25) für eine RNS-Zulage von 2, 4 und 8g, von ZÖLLNER et al. (30) für eine RNS- oder DNS-Zulage von 0,5, 1, 2, und 4g, sowie für eine AMP- oder GMP-Zulage von 616 und 1232mg/70kg Körpergewicht beschrieben. Im Falle von AMP kam es dabei zu einer nahezu quantitativen Absorption (8), die Absorptionsquote läßt sich anhand der angegebenen Durchschnittswerte

der Harnsäureausscheidung zu 90,7 bzw. 95% berechnen; die GMP-Absorption belief sich demgegenüber auf 72,8 bzw. 76%. Zwischen der AMP- und GMP-Absorptionsquote ergab sich somit zwar ein deutlicher Unterschied; berücksichtigt man jedoch die in der Einleitung erwähnte Harnsäureausscheidung über den Darm, die 1/5 bis 1/3 der Harnsäuregesamtausscheidung betragen kann, so ist auch für GMP eine nahezu quantitative intestinale Absorption im geprüften Dosisbereich anzunehmen. Die mit 50 bzw. 25% vergleichsweise niedrigen Absorptionsquoten von RNS bzw. DNS wurden auf niedrige Hydrolyseraten im Darmlumen als limitierenden Faktor zurückgeführt (8). Die über einen weiten Dosisbereich (0,5 - 8g: vgl. (30), sowie (25)) konstanten Absorptionsquoten könnten dann mit der Annahme erklärt werden, daß die RNS- und DNS-abbauenden Enzyme im Darmsaft über den gesamten Dosisbereich substratuntersättigt sind.

Demgegenüber ist es schwierig, eine Erklärung für Größe und Dosisunabhängigkeit der Inosinabsorptionsquote zu finden. Inosin wird ja im Darmlumen nicht weiter abgebaut und als solches absorbiert. Die nahezu quantitativ absorbierten Mononukleotide, z.B. insbesondere AMP, müssen demgegenüber im Darmlumen erst noch dephosphoryliert werden, bevor sie in Form des zugehörigen Nukleosids absorbiert werden können. Nach den von SONODA und TATIBANA (21) bei Mäusen erhobenen Befunden muß man sogar annehmen, daß AMP im Darmlumen zumindest teilweise zu Inosin abgebaut und als solches absorbiert wird. Der große Unterschied zwischen den Absorptionsquoten von Inosin und AMP kann daher nicht hinreichend mit einem möglichen Unterschied der Absorptionsquoten von Inosin und Adenosin erklärt werden. Als denkbarer Mechanismus kommt dagegen eine Verknüpfung der Inosinabsorption mit der Aktivität der intrazellulären Nucleosidphosphorylase in Betracht, was für Fibroblasten beschrieben ist (5). Nucleosidphosphorylase benötigt anorganisches Phosphat zur Spaltung von Ino-

sin. Da in der verwendeten Formeldiät Phosphat nur im Milchpulveranteil und nicht im Salzzusatz (5g NaCl und 3g KCl) enthalten ist, könnte die lokale Phosphatkonzentration in den Mucosazellen bei Absorption einer größeren Inosinmenge unzureichend sein für eine maximale Aktivität der Nukleosidphosphorylase und damit des Inosintransportsystems; bei Verabreichung von AMP stünde dagegen genügend Phosphat zur Verfügung. Diese Hypothese könnte durch einen Ernährungsversuch abgeklärt werden, in dem Inosin mit und ohne anorganisches Phosphat zu verabreichen wäre.

Während die Inosinabsorptionsquote bei allen 3 Versuchspersonen in einer ähnlichen Größenordnung lag (43,7 - 51,6%, durchschnittlich 48,2%), wurde der Harnsäurespiegel im Plasma durch Inosinzulage zur Diät recht unterschiedlich beeinflußt: unter der Gabe von 1g Inosin/70kg stieg die Harnsäurekonzentration im Plasma bei Versuchsperson M nur um 1,19mg/100ml, bei Versuchsperson Z jedoch um fast das Doppelte, nämlich um 2,31mg/100ml an. Dieser Unterschied wird noch deutlicher, wenn man berücksichtigt, daß Versuchsperson Z die geringste Absorptionsquote (43,7%) aufwies. Es ist daher nicht möglich, aufgrund der vorliegenden Daten einen durchschnittlichen Anstieg der Harnsäurekonzentration im Plasma für eine orale Inosinzufuhr von 1g/70kg anzugeben. Der unterschiedliche Anstieg der Harnsäurekonzentration im Plasma bei gleicher Purinaufnahme aus dem Darm beruht auf Unterschieden in der renalen Harnsäureclearance, die interindividuell eine große Variationsbreite zeigt. So fanden LANG et al. (13) bei ihrer Untersuchung der Harnsäureclearance bei 52 Individuen unter konstanter Nahrungspurinzufuhr nur geringe Unterschiede in der täglichen Harnsäureausscheidung ($\pm$ 4% SD), jedoch große Unterschiede der Harnsäurekonzentration im Plasma ($\pm$ 30% SD); eine Korrelation zwischen der Harnsäureausscheidung und der Harnsäurekonzentration im Plasma bestand nicht.

5.2. Diskussion der Ergebnisse der Purinbestimmung in Fleisch

In der Ernährung der angloamerikanischen und der europäischen Länder stellt Fleisch mit Abstand die quantitativ bedeutsamste Purinquelle dar (4). Nachdem die einzelnen in Nahrungsmitteln enthaltenen Purinverbindungen in unterschiedlichem Ausmaß intestinal absorbiert werden, sollte die exakte Zusammensetzung der einzelnen Purinverbindungen in Muskelfleisch bestimmt werden. Da sich die Zusammensetzung der monomeren Purinverbindungen nach der Schlachtung durch Dephosphorylierung und Desaminierung der Adenin-Nukleotide und -Nukleoside rasch ändert (19), unterschiedliche Fleischsorten vor dem Verkauf bzw. Verzehr jedoch verschieden lange Zeit gelagert werden (Rindfleisch!), wurde nicht schlachtfrisches Fleisch, sondern handelsübliches Fleisch aus einer Metzgerei analysiert.

Die Analyse wurde als Doppelbestimmung durchgeführt, d.h. von jeder Fleischsorte wurden zwei Extrakte getrennt hergestellt und komplett analysiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen XV und XVI zusammengestellt. Die Absolutwerte des Gesamtpuringehalts (Tabelle XV) zeigen für die einzelnen Doppelbestimmungen Unterschiede von 2,4 bis 15,5% des jeweiligen Mittelwerts. Tabelle XVI, die den prozentualen Anteil der einzelnen Purinverbindungen am Gesamtpuringehalt der jeweiligen Fleischprobe angibt, zeigt jedoch eine hervorragende Übereinstimmung für alle Doppelbestimmungen. Die Unterschiede in den Absolutwerten können daher nicht auf Meßfehlern beruhen; sie müssen vielmehr durch Fehler bei der quantitativen Überführung des Fleisch-Homogenats aus dem Potttergefäß in das Extraktionsgefäß zustandegekommen sein; diese Überführung ist bei den verwendeten geringen Proben- und Nachwaschvolumina schwierig und könnte durch Nachwaschen des Potttergefäßes mit der zur Extraktion verwendeten Trichloressigsäure sicherlich verbessert werden.

Der Gesamtpuringehalt der untersuchten Fleischproben beträgt durchschnittlich 1,04mmol/100g (0,88 - 1,19mmol/100g) entsprechend einem virtuellen Harnsäuregehalt von 175mg/100g (147 - 201mg/100g) oder einem durchschnittlichen Purin-N-Gehalt von 58,2mg/100g (49,3 - 66,6mg/100g). Der ermittelte Gesamtpuringehalt liegt im Rahmen der Angaben der unterschiedlichen Nahrungsmitteltabellen, die von GRIEBSCH (9) zusammengetragen wurden: sie geben den Purin-N-Gehalt von Schweinefleisch mit 48 - 66mg/100g, von Hühnerfleisch mit 35,4 (fettes Fleisch) - 87mg/100g, von Rindfleisch mit 40 - 58mg/100g und von Kalbfleisch mit 48 - 80mg/100g an.

Den Hauptanteil am Gesamtpuringehalt nehmen mit durchschnittlich 80,5% (75,2 - 85,4%) die monomeren Purinverbindungen ein. Ihre Konzentration in Schweinefleisch wurde mit 8,1 bzw. 9,3µmol/g bestimmt; dieser Wert entspricht dem Ergebnis von POTTHAST und HAMM (19), aus deren Daten sich eine Konzentration der monomeren Purinverbindungen von 8µmol/g berechnen läßt.

Der Anteil der polymeren Purinverbindungen RNS und DNS beträgt durchschnittlich 19,5% (14,6 - 24,8%). Den niedrigsten RNS- und DNS-Gehalt weist erwartungsgemäß Rindfleisch auf, ein Gewebe, in dem keine Wachstumsvorgänge mehr ablaufen. Das Verhältnis von DNS zu RNS ist wesentlicher kleiner als nach den spärlichen Literaturangaben zu erwarten gewesen wäre (s. Einleitung S. 5): es beträgt in Schweine- und Kalbfleisch 1:8, in Rindfleisch 1:10 und in Hühnerfleisch sogar 1:13.

Im Gegensatz zum Gesamtpuringehalt und dem Anteil von monomeren und polymeren Purinverbindungen am Gesamtpuringehalt, die bei allen untersuchten Fleischproben recht ähnliche Werte ergeben haben, zeigt die Zusammensetzung der monomeren Purinverbindungen größere Unterschiede zwischen den einzelnen Fleischproben: In Schweinefleisch bestehen 50% der monomeren Purinverbindungen

(bzw. 40,2% des Gesamtpuringehalts) aus IMP, 31% (bzw. 25,1%) aus Inosin, 12,4% (bzw. 10%) aus Hypoxanthin und 6,6% (bzw. 5,35%) aus ADP. Diese Werte stimmen sehr gut mit den Angaben von POTTHAST und HAMM (19) überein, wenn man berücksichtigt, daß die Extraktion des Fleisches mehr als 24 Stunden nach der Schlachtung vorgenommen wurde und die Ergebnisse daher zwischen den Werten der Extraktion nach 6 Stunden und nach 7 Tagen liegen müssen. Ein Vergleich dieser Ergebnisse wird in Tabelle XVII vorgenommen:

Tabelle XVII: Prozentuale Zusammensetzung der monomeren Purinverbindungen in Schweinefleisch in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer nach der Schlachtung. Daten von POTTHAST und HAMM (19) sowie eigene Meßergebnisse.

Lagerungsdauer	1 Stunde POTTHAST	3 Stunden POTTHAST	6 Stunden POTTHAST	mehr als 1 Tag eigene Messung	7 Tage POTTHAST
ATP	56,4	19,5	8,9	-	-
ADP	30,9	13,2	8,6	6,6	4,5
IMP	8	33,2	53,1	50	46,4
AMP	0,7	14,1	0,6	0,25	1,5
Inosin	4	16,3	19,1	31	36
Hypoxanthin	-	3,7	9,6	12,4	11,5

Aus Tabelle XVII ist ersichtlich, wie rasch nach der Schlachtung ATP und ADP zu IMP, Inosin und Hypoxanthin abgebaut werden. Es ist dabei erstaunlich, daß IMP und Inosin nur in geringem Umfang bis zur Endabbaustufe Hypoxanthin abgebaut werden und auch nach 7 Tagen noch die Hauptkomponenten der monomeren Purinverbindungen darstellen. Offensichtlich stellen sich hier innerhalb des ersten Tages nach der Schlachtung relativ stabile Gleichgewichte der Metaboliten ein: die weitere Dephosphorylierung von IMP

wird hierbei höchstwahrscheinlich durch akkumulierendes anorganisches Phosphat und Inosin gehemmt; Inosin wiederum akkumuliert, da sein Abbau durch die Purinnukleosidphosphorylase von dem gebildeten Hypoxanthin gehemmt wird.

Im Gegensatz zum Schweinefleisch bildete in den übrigen Fleischproben Hypoxanthin mit einem Anteil von durchschnittlich 45,6% (43,1 - 48,4%) die Hauptkomponente der monomeren Purinverbindungen. Dieser Befund ist überraschend und stimmt nicht mit den Angaben der Literatur überein: nach den Untersuchungen von TERASAKI (23) und HAMM und VAN HOOF (10) weisen Hühner- und Rindfleisch nach einer dreitägigen Lagerung bei +4°C die gleiche Hypoxanthinkonzentration auf wie Schweinefleisch. Eine mögliche Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede der Hypoxanthinkonzentration von Schweinefleisch und den übrigen Fleischproben dürften unterschiedliche Lagertemperatur und -Dauer darstellen, die im Einzelnen nicht bekannt sind. So haben SPANN und GRÖBNER (22) nachgewiesen, daß der Hypoxanthingehalt in Fleisch auch unter Tiefkühlbedingungen (-27°C) mit der Lagerdauer zunimmt, was die hohe Hypoxanthinkonzentration in der tiefgefrorenen Hühnerfleischprobe erklären dürfte. Rindfleisch wird bekanntlich lange abgelagert, wobei die Lagerungstemperatur möglicherweise über + 4°C liegen kann. Angaben über den Hypoxanthingehalt oder die Lagerungsbedingungen von Kalbfleisch liegen nicht vor.

Der Inosinanteil an den monomeren Purinverbindungen lag bei Rindfleisch mit 27,5% in einer ähnlichen Größenordnung wie bei Schweinefleisch, bei Hühner- und Kalbfleisch mit 16,6 bzw. 19,5% deutlich darunter. Der prozentuale Anteil von Inosin am Gesamtpuringehalt betrug bei Rindfleisch 23,3%, bei Kalbfleisch 15,9% und bei Hühnerfleisch 12,6%. Bei kürzerer Lagerungsdauer dürfte sich in Analogie zum Schweinefleisch das Verhältnis von Hypoxanthin zu Inosin zugunsten von Inosin verschieben. Inosin stellt somit sicherlich ein quantitativ bedeutsames Nahrungspurin dar.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Fleisch ist die quantitativ bedeutendste Purinquelle unserer Ernährung. Weder über die Zusammensetzung der in Fleisch enthaltenen Purinverbindungen noch über deren intestinale Absorptionsquoten sind vollständige Literaturangaben erhältlich. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Zusammensetzung der Purinverbindungen in handelsüblichem Schweine-, Hühner-, Rind- und Kalbfleisch untersucht: es ergab sich ein durchschnittlicher Gesamtpuringehalt von 1,04mmol entsprechend einem Purin-N-Gehalt von 58,2mg oder einem virtuellen Harnsäuregehalt von 175mg pro 100g; den Hauptanteil am Gesamtpuringehalt nahmen mit durchschnittlich 80,5% die monomeren Purinverbindungen ein, der RNS-Anteil belief sich auf 17,7%, der DNS-Anteil auf 1,8%. Schweinefleisch zeigte eine von den anderen Fleischsorten abweichende Zusammensetzung der monomeren Purinverbindungen: 50% bestanden aus IMP, 31% aus Inosin, 12,4% aus Hypoxanthin und 6,6% aus ADP. Bei Hühner-, Rind- und Kalbfleisch stellte dagegen Hypoxanthin mit durchschnittlich 45,6% die Hauptkomponente dar; der Anteil von Inosin belief sich hier auf 16,6, 27,5 und 19,5%, der von IMP auf 31,3, 17,7 und 28,1%.

Inosin stellt somit in allen untersuchten Fleischproben eine wichtige Komponente dar. Da das Ausmaß seiner intestinalen Absorption im Gegensatz zu RNS (50%), DNS (25%) und Mononukleotiden (70 - 90%) nicht bekannt ist, wurde die Absorptionsquote von Inosin in einem Ernährungsversuch ermittelt: 3 gesunde Versuchspersonen wurden 30 Tage lang mit einer purinfreien synthetischen Formeldiät ernährt; täglich wurde die Harnsäureausscheidung im 24-Stunden-Urin und jeden zweiten Tag die Harnsäurekonzentration im Plasma bestimmt. Innerhalb der ersten 10 Tage

der purinfreien Ernährung ging die renale Harnsäureausscheidung auf einen konstanten Basalwert zurück, der der "endogenen" Harnsäurebildung aus de-novo synthetisierten Purinen entspricht. Während der zweiten 10-Tage-Periode erhielten die Versuchspersonen tägliche Inosindosen von 0,5g/70kg Körpergewicht, während der dritten 10-Tage-Periode 1g Inosin/70kg. Durch diese exogene Purinzufuhr erhöht sich die renale Harnsäureausscheidung innerhalb weniger Tage, während deren der Harnsäurepool des Körpers aufgefüllt wird, um einen Betrag, der der absorbierten Purinmenge, d.h. der "exogenen" Harnsäure entspricht. Für die 2. Versuchsperiode mit der Zulage von 0,5g Inosin/70kg Körpergewicht konnte leider nur bei einer Versuchsperson eine konstante Mehrausscheidung von Harnsäure festgestellt werden; diese entsprach einer Inosin-Absorptionsquote von 50,7%. Am Ende der 3. Versuchsperiode mit der Zulage von 1g Inosin/70kg war aus der Harnsäuremehrausscheidung für die gleiche Versuchsperson eine Inosinabsorptionsquote von 51,6% zu berechnen. Für die beiden anderen Versuchspersonen betrug die Absorptionsquote 49,2 bzw. 43,7%. Insgesamt ergibt sich für Inosin somit eine durchschnittliche intestinale Absorptionsquote von 48,8%. Nach dem Ergebnis von allerdings nur einer Versuchsperson ist diese Absorptionsquote im untersuchten Dosisbereich dosisunabhängig, ein Befund, der bereits für die anderen genannten Purinverbindungen (RNS, DNS, Mononukleotide) erhoben worden ist und im Fall von Inosin auf eine fehlende Substratsättigung der möglicherweise mit dem Inosin-Transportsystem gekoppelten Purinnukleosidphosphorylase zurückzuführen sein dürfte.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) DU BOIS, D., DU BOIS, E.F.:
In: Documenta Geigy.
Wissenschaftliche Tabellen. 7. Auflage, 533.
J.R. Geigy AG, Pharma, Basel (1968)

(2) BOOTHBY, DU BOIS:
In: Documenta Geigy.
Wissenschaftliche Tabellen. 7. Auflage, 536.
J.R. Geigy AG, Pharma, Basel (1968)

(3) CLIFFORD, A.J., STORY, D.L.:
Levels of purines in foods and their metabolic effects in rats.
J. Nutr. 106, 435 - 442 (1976)

(4) COE, F.L., MORAN, E., KAVALICH, A.G.:
The contribution of dietary purine over-consumption to hyperuricosuria in calcium oxalate stone formers.
J. Chron. Dis. 29, 793 - 800 (1976)

(5) COHEN, A., MARTIN, D.W.Jr.:
Inosine uptake by cultured fibroblasts from normal and purine nucleoside phosphorylase deficient humans.
J. Biol. Chem. 252, 4428 - 4430 (1977)

(6) ELION, G.B.:
Allopurinol and other inhibitors of urate synthesis.
In: W.N. Kelley, I.M. Weiner (Hrsg.): Uric Acid. Handbook of Experimental Pharmacology. Bd. 51, 485 - 514,
Springer, Berlin (1978)

(7) GILES, K.W., MYERS, A.:
An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonuleic acid.
Nature 4979, 93 (1965)

(8) GRIEBSCH, A., ZÖLLNER, N.:
Effect of ribomononucleotides given orally on uric acid production in man. In: Sperling, O., de Vries, A., Wyngaarden, J.B. (Hrsg..): Advances in Experimental Medicine and Biology. Bd. 41 B: 443 - 449, Plenum Press, New York (1974)

(9) GRIEBSCH, A.:
Diät einschließlich experimenteller Grundlagen.
In: Zöllner, N., Gröbner, W., (Hrsg.): Gicht. Handbuch der Inneren Medizin,
5. Aufl., Bd. 7/3, 536 - 560, Springer, Berlin (1976)

(10) HAMM, R., VAN HOOF, J.:
Einfluß der Zerkleinerung auf den Abbau von Adenosintriphosphat und Glykogen im Rindermuskel post mortem.
Z. Lebensmittelunters. u. - Forsch. 147, 193 - 200 (1971)

(11) HARKNESS, R.A., SIMMONDS, R.J., COADE, S.B.:
Purine transport and metabolism in man. The effect of exercise on concentrations of purine-bases, nucleosides and nucleotides in plasma, urine, leukocytes and erythrocytes.
Clin. Sci 64, 333 - 340 (1983)

(12) HOPPE-SEYLER, F., THIERFELDER, H.:
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.
Lang, K., Lehnartz, E. (Hrsg.).10. Auflage, Bd. V, 526 und Bd. IV/2, 1309 f.
Springer, Berlin (1953 u. 1960)

(13) LANG, F., GREGER, R., OBERLEITHNER, H., GRISS, E., LANG, K., PASTNER, D., DITTRICH, P., DEETJEN, P.:
Renal handling of urate in healthy men, in hyperuricaemia and renal insufficiency: circadian fluctuation, effect of water diuresis and of uricosuric agents.
Europ. J. Clin. Invest. 10, 285 - 292 (1980)

(14) LANG, K., SCHÄFFNER, E.:
Die thermische Behandlung von Ribonucleinsäure und deren ernährungsphysiologische Bedeutung.
Z. Ernährungswiss. 4, 235 - 245 (1964)

(15) LESLIE, I.:
The nucleic acid content of tissues and cells.
In: Chargaff, E., Davidson, J.N. (Hrsg.):
The Nucleic Acids, Chemistry and Biology.
Bd. 2, 1 - 50, Academic Press, New York (1955)

(16) OGUR, M., ROSEN, G.:
The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid.
Arch. Biochem. 25, 262 - 276 (1950)

(17) PERRETT, D.:
Application of high performance liquid chromatography (HPLC) to biochemical analysis.
In: Kornberg, H.L., Metcalfe, J.C., Northcote, D.H., Pogson, C.I., Tipton, K.F. (Hrsg.): Techniques in Metabolic Research. Bd. 215, 1 - 22.
Elsevier, North Holland (1979)

(18) PERRETT D., SAHOTA, A., SIMMONDS, H.A., HUGH-JONES, K.:
Deoxyadenosine metabolism in the erythrocytes of children with severe combined immunodeficiency.
Bioscience Reports 1, 933 - 944 (1981)

(19) POTTHAST, K., HAMM, R.:
Eine Routinemethode zur quantitativen Bestimmung von ATP und seinen Abbauprodukten im Muskel post mortem.
J. Chromatogr. 42, 558 - 562 (1969)

(20) PRAETORIUS, E., POULSEN, H.:
Enzymatic determination of uric acid with detailed directions.
Scand. J. Lab. Invest. 5, 273 (1953)

(21) SONODA, T., TATIBANA, M.:
Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice.
Biochim. Biophys. Acta 521, 55 - 66 (1978)

(22) SPANN, K.W., GRÖBNER, W.:
Hypoxanthin im Fleisch und dessen Einfluß auf den Harnsäurestoffwechsel des Menschen.
Aktuelle Ernährungsmedizin 5, 8 - 11 (1980)

(23) TERASAKI, M.:
The flavor of meats.
Scientific Information Bulletin Ribotide No. 26, Takeda (1965)

(24) VOLKIN, E., COHN, W.E.:
Estimation of nucleic acids.
In: Glick, D. (Hrsg.): Methods of Biochemical Analysis. Bd. 1, 287 - 305. Interscience Publishers, New York (1957)

(25) WASLIEN, C.I., CALLOWAY, D.H., MARGEN, S.:
Uric acid production of men fed graded amounts of egg protein and yeast nucleic acid.
Am. J. Clin. Nutr. 21, 892 - 897 (1968)

(26) WEBSTER, D.R., SIMMONDS, H.A., BARRY, D.M.J., BECROFT, D.M.O.:
Pyrimidine and purine metabolites in ornithine transcarbamylase deficiency.
J. Inher. Metab. Dis. 4, 27 - 33 (1981)

(27) ZÖLLNER, N.:
Gesamtstoffwechsel.
In: Zöllner, N. (Hrsg.):Thannhausers Lehrbuch des Gesamtstoffwechsels.
Thieme, Stuttgart (1957)

(28) ZÖLLNER, N.:
Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung - Normalwerte in der deutschen Bevölkerung.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1, 178 - 182 (1963)

(29) ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W.:
Der unterschiedliche Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 3, 56 - 58 (1970)

(30) ZÖLLNER, N., GRIEBSCH, A., GRÖBNER, W.:
Einfluß verschiedener Purine auf den Harnsäurestoffwechsel.
Ernährungsumschau 3, 79 - 82 (1972)

(31) ZÖLLNER, N.:
Diet and gout.
Proc. 9th int. Congr. Nutrition, Mexico 1972, Bd. 1, 267 - 277, Karger, Basel (1975)

8. L E B E N S L A U F

Am 27. Mai 1956 wurde ich, Helene Gimpel, als drittes Kind der Kaufleute Nathan und Chana Gimpel in New York, USA, geboren.

Während meiner ersten Lebenswochen übersiedelte meine Familie nach München, wo ich Kindheit und Jugend verbrachte.

Im Alter von sechs Jahren wurde ich 1962 in die Volksschule am Bayernplatz, München, eingeschult und trat 1966 in den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Willi-Graf Gymnasiums, München, über.

1973 - 1975 besuchte ich das Sophie-Scholl Gymnasium, München, und schloß dort meine Schulzeit mit dem Abitur ab.

Noch im selben Jahr erhielt ich die Zulassung für das Studium der Human-Medizin an der Münchner Ludwig-Maximilians Universität. 1979/1980 ließ ich mich für ein Jahr beurlauben, um als Gaststudent am Londoner Hammersmith Hospital Erfahrungen zu sammeln. Zwei Tertiale meines Praktischen Jahres verbrachte ich ebenfalls in London und zwar an der King's College Hospital Medical School und Guy's Hospital Medical School.

Die Ärztliche Prüfung legte ich 1982 in München ab.

Herrn Prof. Dr. N. Zöllner, der mir ermöglichte, diese Arbeit im Purinlabor seiner Klinik durchzuführen,

Herrn Prof. Dr. W. Gröbner, der mir das Thema der Arbeit freundlicherweise überließ,

Herrn Dipl. Ing. W. Spann und Herrn Dr. med. W. Löffler, die mich mit ihren Erfahrungen bei der Durchführung des Ernährungsversuches stets unterstützten,

Herrn Dr. med. S. Reiter für seine große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der HPLC-Arbeiten und der Korrektur der Niederschrift,

möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen.